

Uusien psykoaktiivisten aineiden kemiallinen tunnistus

Sara Pasanen

Pro gradu –tutkielma

huhtikuu 2019

Helsingin yliopisto



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

MATEMAATTIS-LUONNONTIEDELLINEN TIEDEKUNTA
MATEMATISK-NATURVETENSKAPLIGA FAKULTETEN
FACULTY OF SCIENCE

Kemian ja molekyyli-tieteiden maisteriohjelma

Tiedekunta – Fakultet – Faculty		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree programme	
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Kemian ja molekyyli-tieteiden koulutusohjelma	
Tekijä – Författare – Author			
Sara Pasanen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Uusien psykoaktiivisten aineiden kemiallinen tunnistus			
Työn laji – Arbetets art – Level	Aika – Datum – Month and year	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages	
Pro Gradu -tutkielma	4/2019	69	
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Uudet psykoaktiiviset aineet ovat yhdisteitä, jotka ovat johdettu jo tunnetuista huumausaineista muuttamalla niiden molekyyli-rakenteita. Muutoksilla pyritään kiertämään huumausaineiden lainsäädäntöä. Uuden yhdisteen ilmaantuessa huumausainekäyttöön viranomaisten on pyrittävä saamaan aine mahdollisimman nopeasti lainsäädännön alaiseksi. Samaan aikaan huumausainekäyttöön voi ilmestyä monta muuta uutta ainetta.</p> <p>Aineiden tunnistus nojaa tällä hetkellä vertailuainepohjaisiin analyyseihin. Luotettavien vertailuaineiden löytäminen ei ole uuden aineen kohdalla helppoa, joten vertailuaineet ovat usein analyysiaikoja pidentävä tekijä. Tämän lisäksi ainoastaan vertailuaineisiin luottavilla tunnistusmenetelmillä laboratorion tietokannan ulkopuolella olevia aineita ei voida tunnistaa näytteistä. Tätä varten on kehitetty laajempia laboratorioden välisiä tietokantoja, jotka ovat entistä kattavampia vaihtoehtoja vertailuaineiden rinnalla.</p> <p>Tämän pro gradu -tutkielman kirjallinen osa käy läpi uusia psykoaktiivisia aineita ja niiden tunnistukseen käytettäviä laitteistoja ja menetelmiä. Uusissa psykoaktiivisissa aineissa keskitytään etenkin synteettisiin kannabinoideihin, fenetyyliamiini- ja fentanyylijohtannaisiin. Tunnistusmenetelmistä käydään läpi immunokemialliset, kolorimetriset, kromatografia- ja massaspektrometripohjaiset menetelmät.</p> <p>Tutkielman kokeellinen osa suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen toksikologian laboratoriossa. Työn suoritus alkoi 56 uuden psykoaktiivisen aineen tunnistamisella ja viemisellä laboratorion tietokantaan vertailuaineiden avulla. Tunnistukset tehtiin korkean erotuskyvyn neste-kromatografian ja kvadrupoli-lentoaika -massa-analysaattorilla hyödyntäen datankäsittelyohjelmia. Tutkimuksen toinen osa keskittyi m/zCloud -tietokannan tutkimiseen uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistuksessa. Tarkoituksena oli selvittää kuinka ohjelmisto soveltuu vertailuaineettomien aineiden tunnistukseen ja luoda kriteerit aineiden tunnistukseen.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
Uudet psykoaktiiviset aineet, Kvalitatiivinen analyysi, Massaspektrometria, Toksikologia			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto HELDA/eThesis			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

LYHENTEET.....	3
1. JOHDANTO.....	4
2. KIRJALLISUUSOSA.....	5
2.1. Uudet psykoaktiiviset aineet.....	5
2.1.1. Yhdisteiden luokittelu.....	6
2.1.2. Uusien psykoaktiivisten aineiden molekyyliarakenteet.....	7
2.2. Kvalitatiiviset menetelmät.....	12
2.2.1. Näyttemateriaalin merkitys kvalitatiivisessa huumausaineanalytiikassa...	13
2.2.2. Kolorimetrinen tunnistus.....	13
2.2.3. Immunokemiallinen tunnistus.....	14
2.2.4. Kaasukromatografi-massaspektrometria.....	15
2.2.5. Nestekromatografi-massaspektrometria.....	19
2.2.6. Massaspektrometria.....	19
2.3. Kvadrupoli-lentoaika – analysaattorilla tehtävät mittaukset.....	25
2.3.1. Yhdisteiden fragmentoituminen laitteistossa.....	27
2.4. Tunnistus datankäsittelyohjelmien avulla.....	28
3. KOKEELLINEN OSA.....	31
3.1. Johdanto.....	31
3.2. Materiaalit ja menetelmät.....	33
3.2.1. Vertailuaineet.....	33
3.2.2. Nestekromatografi- massaspektrometrilaitteisto ja menetelmä.....	35

3.2.3. Työssä käytetyt ohjelmistot.....	36
3.2.4. m/zCloud-tietokanta.....	36
3.3. Mittausten kulku ja tulokset.....	38
3.3.1. Fragmentoituminen.....	38
3.3.2. Yhdisteiden vienti tietokantaan.....	42
3.3.3. Yhdisteiden tunnistaminen ilman referenssistandardia.....	42
3.3.4. Kriteerit yhdisteiden tunnistamiselle.....	46
4. YHTEENVETO.....	48
5. VIITELUETTELO.....	50
6. LIITTEET.....	54

LYHENTEET

bbCID	Broadband collision incuded dissociation – laaja-alainen mittaus
EI	Elektroni-ionisaatio
ESI	Sähkösumutusionisaatio
FT-ICR	Fourier-ionisyklotroniresonanssiteknologia
FWHM	Full width at half maximum – puolikorkeuden leveys
GC	Kaasukromatografia
HRMS	Korkean erotuskyvyn massaspektrometri
LC	Nestekromatografia
LRMS	Matalan erotuskyvyn massaspektrometri
MS	Massaspektrometria
MS/MS	Tandem-massaspektrometria
NCE	Normalized collision energy – normalisoitu törmäysenergia
QqQ	Kolmoiskvadrupoli
THC	Tetrahydrokannabinoli
TOF	Time of flight – lentoaika-analysaattori
UHPLC	Korkean erotuskyvyn nestekromatografi

1. JOHDANTO

Uudet psykoaktiiviset aineet ovat tällä hetkellä maailmanlaajuinen ongelma sekä lainsäädäntöjen että terveydenhuollon kannalta. Lainsäädännöllisesti aineet ovat ongelmallisia, sillä uusia aineita ilmaantuu huumausainekäyttöön jatkuvasti. Terveydenhuollon kannalta puolestaan ongelmallisia ovat aineiden toksiset vaikutukset. Aineiden luotettava ja nopea tunnistus esimerkiksi rikos- ja tullilaboratorioissa on ensisijaisen tärkeää saatettaessa uusia psykoaktiivisia aineita lainsäädännön alaisiksi. Uusien psykoaktiivisten aineiden tutkiminen onkin niitä valmistavien laboratorioden ja viranomaisten jatkuva kilpailu ajasta. Viranomaiset pyrkivät saamaan uuden yhdisteen mahdollisimman nopeasti luokiteltua huumausaineeksi, jolloin sen levittäminen käy vaikeammaksi. Samalla huumauskäyttöön voi ilmestyä monta uutta psykoaktiivista ainetta, jotka vaativat reagointia.

Nykyään uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistus on siirtynyt entistä enemmän immunokemiallisista menetelmistä kromatografia- ja massaspektrometripohjaisiin tunnistuksiin.¹ Tunnistuksissa käytetään apuna aineiden sertifioituja vertailuaineita tai tutkittuja takavarikkonäytteitä. Uusien tunnistusmenetelmien kehittäminen on jatkuvasti ajankohtaista, sillä uusia psykoaktiivisia aineita löydetään useita kymmeniä joka vuosi.²

Tutkielman kirjallisessa osassa käydään läpi ensin uusien psykoaktiivisten aineiden tämänhetkisiä trendejä ja vertaillaan uusien psykoaktiivisten aineiden rakenteita molekyyliin, joihin niiden vaikutukset perustuvat. Tämän lisäksi vertaillaan yleisimpiä menetelmiä ja laitteistoja aineiden tutkimiselle. Lopuksi käydään lyhyesti läpi, miten datankäsittely tukee aineiden tunnistusta ja mitä mahdollisuuksia se tarjoaa rutiinianalytiikassa.

Tutkielman kokeellinen osa koostuu kahdesta osasta. Ensimmäisessä osiossa käydään läpi 56 uuden yhdisteen karakterisointi ja vieminen laboratorion sisäiseen tietokantaan. Toisessa osuudessa tutkitaan mahdollisuuksia tunnistaa uusia yhdisteitä spektrivertailun avulla verkkoympäristössä. Toisessa osassa hyödynnetään ensimmäisestä osasta saatuja spektrejä ja simuloidaan tilannetta, jossa tavoitteena on vähintään alustava tunnistus tunnistamatta jääneelle yhdisteelle.

2. KIRJALLISUUSOSA

2.1. Uudet psykoaktiiviset aineet

Uudet psykoaktiiviset aineet ovat useimmiten jo tunnettujen huumausaineiden synteettisiä analogeja tai johdannaisia. Muuttamalla kontrolloitujen aineiden rakennetta pyritään kiertämään huumausaineita koskevaa lainsäädäntöä. Lainsäädännöt ovat usein sidottuja tiettyyn molekyyliarakenteeseen, joten pienet muutokset rakenteessa estävät niiden soveltamisen uusiin psykoaktiivisiin aineisiin. Uusilla psykoaktiivisilla aineilla on rakenteellisista muutoksista huolimatta samankaltaisia keskushermostovaikutuksia kuin perinteisillä huumausaineilla. Yhdisteiden myynti tapahtuu etenkin EU:ssa enimmäkseen internetin välityksellä. Kaupittelu käydään hämäävien termien kuten kylpysuolujen, huonetuoksujen tai suitsukkeiden nimillä.¹

Vielä viisi vuotta sitten EU:n uusiin psykoaktiivisiin aineisiin keskittyneeseen varhaisvaroitusjärjestelmään oli kirjattu alle 400 yhdistettä.³ Viimeisimmän raportin mukaan nykyään seurannassa on jo ainakin 670 ainetta, joista 400:a esiintyy vuosittain. Vuosittainen kasvu on hidastunut, mutta siitä huolimatta uusia aineita ilmoitetaan noin viikoittain listalle.²

Uudet psykoaktiiviset aineet muistuttavat alkuperäistä huumausainetta muuten farmakologisilta vaikutuksiltaan, mutta niillä voi olla lisäksi yllättäviä toksisia vaikutuksia. Nämä vaikutukset voivat liittyä annostukseen, tehokkuuteen tai aktiivisiin metaboliitteihin. Vaikutukset nähdään usein vasta tuotteen ollessa jo huumeikäytössä, sillä uudet psykoaktiiviset aineet eivät luonnollisestikaan käy läpi valvottua testausta. Tämä luo haasteita terveydenhuollolle, tutkijoille ja päättäjille. Usein yhdisteiden olemattomien esitetietojen lisäksi aikataulu tutkimuksessa ja lakien säätämisessä on selvästi tiukempi kuin perinteisten huumausaineiden kohdalla.⁴

2.2.1. Yhdisteiden luokittelu

Uusien psykoaktiivisten yhdisteiden luokittelu tehdään joko vaikutusten tai niiden kemiallisen rakenteen perusteella. Yhdisteet voivat psykoaktiivisten ominaisuuksiensa puolesta olla esimerkiksi stimulantteja, empatogeeneja tai hallusinogeenia. Luokittelu kemiallisen rakenteen perusteella on kuitenkin kemiallisessa analytiikassa luontevampaa, joten sitä suositetaan tässä tutkielmassa. Kemialliselta rakenteeltaan yhdisteet voidaan luokitella esimerkiksi synteettisiin kannabinoideihin, fenetyyliamiineihin, opioideihin, amfetamiineihin, katinoneihin, piperatsiineihin, piperidiineihin, aminoindaaneihin, bentsofuraaneihin ja tryptamiineihin. Kemiallisten ryhmien sisällä esiintyy rakenne-eroista johtuvia suuria eroja vaikutuksissa keskushermostoon sekä toksisissa vaikutuksissa.⁵

Tutkielman kirjoittamishetkellä näkyvimmat ryhmät EU:n markkinoilla ovat synteettiset opioidit, kannabinoidit, katinonit ja bentsodiatsepiinit. Etenkin synteettisistä opioideista fentanyylijohtannaisten määrä on huolestuttavasti kasvussa. Vuosien 2009 ja 2018 välissä tunnistettiin 28 uutta fentanyylijohtannaista, joista kymmenen tunnistettiin vuonna 2017. Vaikka kokonaismääriltään fentanyyliin ilmaantuminen on muihin huumeisiin verrattuna vähäistä, niiden haitalliset vaikutukset nousevat jo nyt esille.² Tämän lisäksi fentanyylijohtannaisia on viime vuosina havaittu seoksina muiden huumausaineiden, kuten heroinin kanssa. Näissä tapauksissa yliannostuksen riski on hyvin suuri, kun seoksen komponenteissa on heroiniä merkittävästi voimakkaampia yhdisteitä.⁶

Yhdistemäärältään suurin uusien psykoaktiivisten aineiden ryhmä on synteettiset kannabinoidit. Ne vaikuttavat kehossa samaan reseptoriin kuin delta-9-tetrahydrokannabinoli (engl. tetrahydrocannabinol, THC), mutta ovat kemiallisen rakenteensa puolesta hyvin monimuotoinen ryhmä. Vuoteen 2018 mennessä oli tunnistettu 179 kannabinoidia. Kuten fentanyyliin tapauksessa, myös monet synteettiset kannabinoidit ovat tetrahydrokannabinolia huomattavasti voimakkaampia ja vaikutuksiltaan monimuotoisempia. Sama pätee myös muihin synteettisiin valmisteisiin. Tämä tarkoittaa sitä, että myrkytyksen oireita esiintyy paljon pienemmillä pitoisuuksilla kuin perinteisillä valmisteilla.⁷

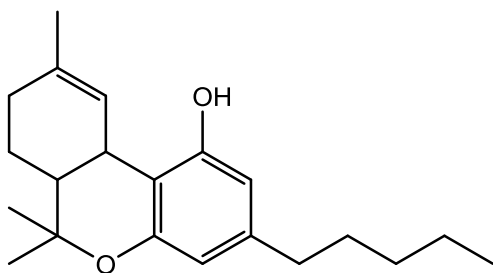
Kolmas esillä ollut ryhmä on amfetamiinijohtannaiset ja etenkin niihin kuuluvat katinonijohdannaiset. Ryhmän yhdisteet aiheuttavat käyttäjille samankaltaisia vaikutuksia kuin amfetamiini tai kokaiini.⁸ Katinonijohdannaisen osuus takavarikoiduista aineista vuonna 2016

oli noin kolmasosa kokonaismäärästä. Määrä oli edellisvuosiin nähden hieman laskussa, mutta silti vuoden 2016 aikana ne muodostivat edelleen kannabisjohdannaisten kanssa 80 % takavarikoiden määrästä.²

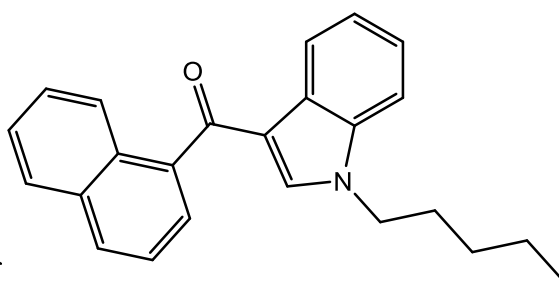
2.1.2. Uusien psykoaktiivisten aineiden molekyyliarakenteet

Siitä huolimatta, että uudet sekä vanhat psykoaktiiviset yhdisteet kuuluvat melko pieneen määrään kemiallisia ryhmiä, on niistä kasvanut erittäin laajakirjoinen joukko. Reaktiomekanismien tuntemuksen kautta molekyyliarakenteiden muokkaaminen on helpottunut huomattavasti ja siten luonut mahdollisuuden lukemattomien uusien yhdisteiden synteesiin.⁹ Tässä kappaleessa käsitellään tyypillisiä molekyyliarakenteeseen tehtäviä muutoksia. Muutoksilla pyritään lainsäädännön kiertämisen lisäksi säilyttämään yhdisteen psykoaktiiviset ominaisuudet tai jopa vahvistamaan niitä. Katsauksessa keskitytään synteettisten kannabinoidien, katinoni- ja fentanyylijohtannaisryhmien rakenteisiin niiden ajankohtaisuuden ja markkinaosuuksien perusteella.

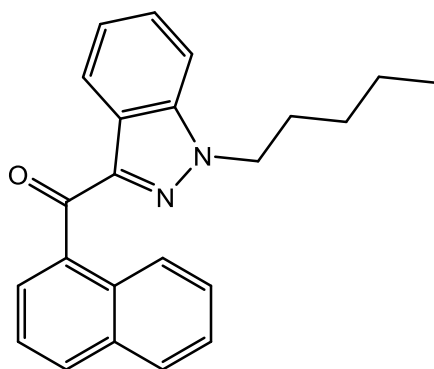
Synteettisiä kannabinoideja sisältäviä tuotteita havaittiin ensimmäisen kerran huumausainekäytössä 2000-luvun alussa. Yhdisteryhmän vaikutukset perustuvat kannabiksen vaikuttavan aineen eli THC:n tavoin vuorovaikutuksiin kehon kannabinoidireseptoreihin. THC:n rakenne sisältää fenolirenkaan johon on liittynyt pentyyliryhmä ja sykliisiä rakenteita (kuva 1). Synteettisistä kannabinoideista ensimmäisiä oli naftoyyli-indoleihin kuuluva JWH-018. Naftoyyli-indoleita seurasivat naftoyyli-indatsolit, kuten esimerkiksi THJ-018 sekä indatsolikarboksamidit, esimerkiksi AKB-48. Viimeisimpinä huumeikäyttöön ovat ilmestyneet indolikarboksamidit, kuten esimerkiksi MDMB-CHMICA.¹⁰ Synteettisten kannabinoidien rakenteet eroavat huomattavasti THC:n rakenteesta.



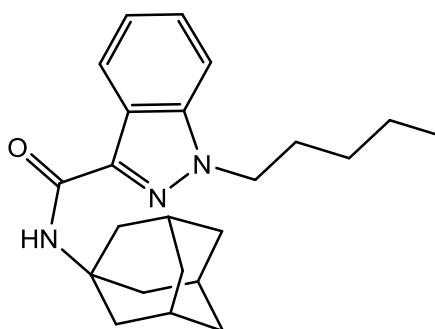
1. THC



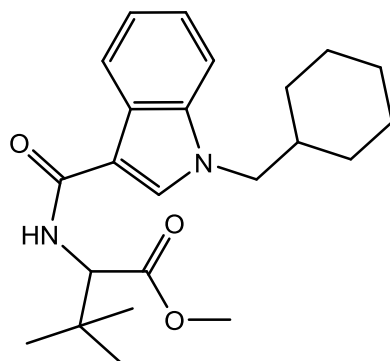
2. JWH-018



3. THJ-018



4. AKB-48

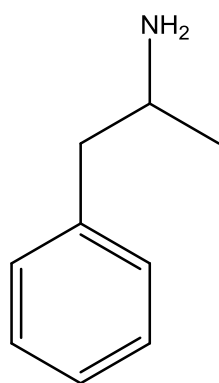


5. MDMB-CHMICA

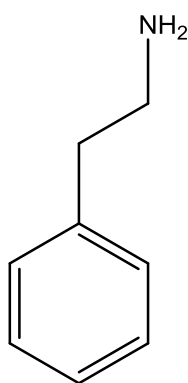
Kuva 1. THC:n ja synteettisten kannabinoidien rakenteita. Kuvan molekyylit esittävät seuraavien huumausaineiden rakennekaavoja; 1. THC, 2. 1-pentyyli-3-(1-naftoyyli)indoli (JWH-018), 3. 1-naftalenyyli(1-pentyyli-1H-indatsoli-3-yyli)-metanoni (THJ-018), 4. 1-pentyyli-N-(trisyklo[3.3.1.1.3]dek-1-yyli)-1H-indatsoli-3-karboksamidi (AKB-48) ja 5. metyyli-2-(1-(sykloheksyyylimetyyli)-1H-indoli-3-karboksamido)-3,3-dimetyylibutanoaatti (MDMB-CHMICA).

Seuraavaksi yleisimpien ryhmien, eli fenetyyliamiini- ja katinonijohdannaisten eroavaisuuksia alkuperäisistä molekyyliarakenteista on kuvattu useaan otteeseen kirjallisuudessa.^{9,11,12} Katinonimolekyyli sisältää bentseenirenkaan, karbonyyliryhmän ja primäärisen amiinin (kuva 2). Esimerkiksi alkyyliryhmän lisäys katinonin primääriseen amiiniin liittyneen vetyatomin paikalle keksittiin jo 1980-luvulla. Keksintö loi metkatinonit, joiden helppo synteesi kaupallisista kemikaaleista loi mahdollisuudet laajalle tuotannolle. Metkationeita on kehitelty edelleen esimerkiksi alkyyli-, halogeeni- tai alkoksiryhmän lisäyksellä katinonin rengasrakenteeseen.⁹

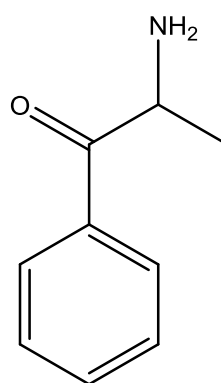
Samankaltaisia muutoksia on tehty myös fenetyyliamiinien luokkaan kuuluville amfetamiinijohdannaisille (kuva 2). Fenetyyliamiini sisältää hiiliketjun lisäksi vain bentseenirenkaan ja primäärisen amiinin. Amfetamiinin rakenne eroaa fenetyyliamiinimolekyylistä vain liitetyn metyyliiryhmän takia. Amfetamiinirakenteessa etenkin bentseenirenkaan muokkaus on yleistä. Johdannaiset sisältävät esimerkiksi metyyli- tai furaaniryhmiä liitettynä bentseenirenkaaseen tai alkyyliamiiniin. Bentseenirenkaan korvaaminen heterosyklisillä rakenteilla on myös mahdollista.¹²



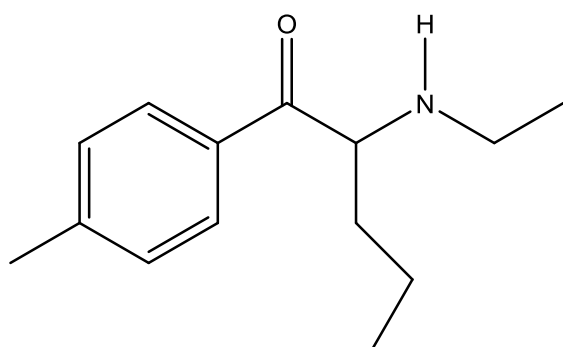
1. Amfetamiini



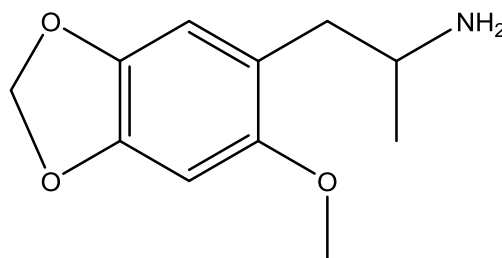
2. Fenetyyliamiini



3. Katinonirakenne



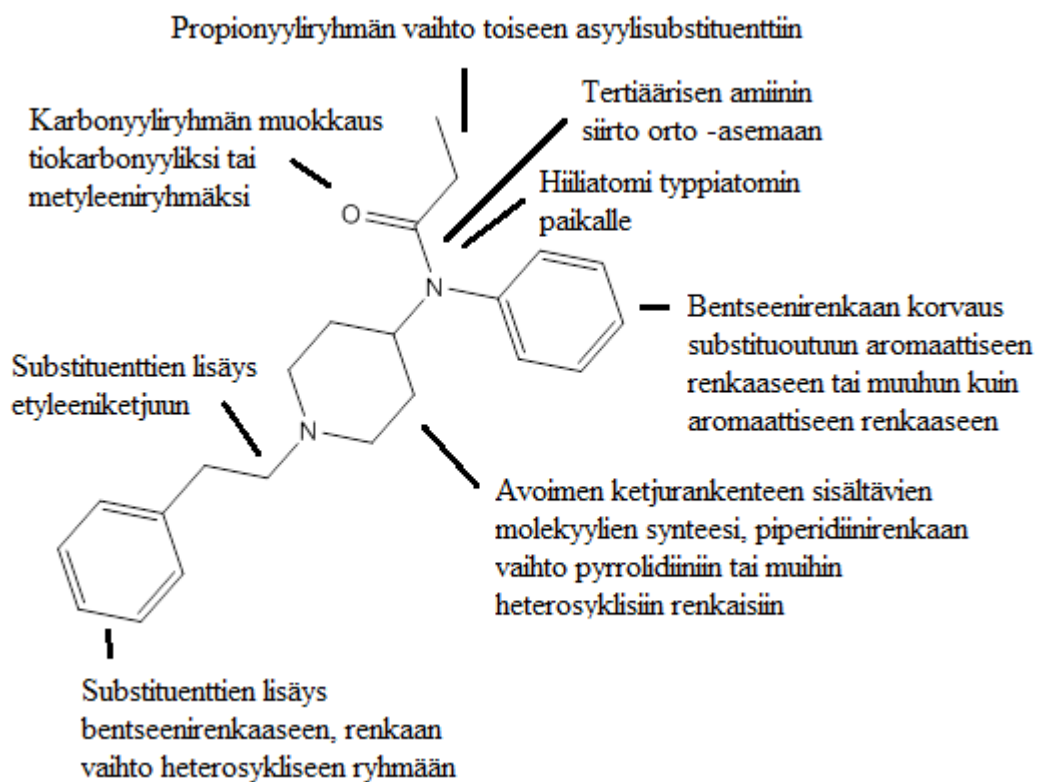
4. 4-MEAP



5. MDMA-2

Kuva 2. Fenetyyliamiinin ja katinonirakenteen havainnoillistaminen. Fenetyyliamiinin johdannaisista esimerkkinä α -metyylifentetyyliamiini (amfetamiini). Synteettisen katinonijohdannaisen esimerkkinä 4-metyyli- α -etyyliaminopentiofenoni (4-MEAP) ja amfetamiinijohdannaisen esimerkkinä 2-metoksi-4,5-metyleenidioksiamfetamiini (MDMA-2).

Fentanyylijohtannaisten joukko on nimensä mukaisesti lähtöisin fentanyylimolekyylistä. Molekyylissä sisältää kaksi bentseenirengasta, piperidiinirengaan, tertiäärisen amiinin ja karbonyyliryhmän. Rakenne on fenetyyliamiinia ja katinonia monimutkaisempi, mutta tavat muokata molekyylä ovat osittain samoja. Kuva 3 esittelee keinoja muokata fentanyylimolekyylin rakennetta. Uusia yhdisteitä on kehitetty esimerkiksi lisäämällä sivuketjuja tai vaihtamalla bentseenirenkaita heterosyklisiin ryhmiin jo olemassa olevissa yhdistemolekyyleissä.



Kuva 3. Fentanyylimolekyyli ja sen mahdollisia muokkaustapoja.¹³

Kuten nähdään, uudet psykoaktiiviset aineet ovat laaja ja monimuotoinen yhdistejoukko. Esimerkiksi molekyylien vesiliukoisuudessa, kiehumispisteessä ja fragmentoitumisessa on paljon eroja. Nämä erot mahdollistavat osaltaan yhdisteiden tunnistamisen, mutta samalla luovat haasteita käytettäville esikäsittely- ja analyysimenetelmille.

2.2. Kvalitatiiviset menetelmät

Uusien psykoaktiivisten aineiden analytiikka jaetaan kvalifiointiin eli tunnistukseen ja kvantitointiin eli pitoisuusmäärittelyksi. Tässä tutkielmassa keskitytään uusien psykoaktiivisten aineiden kvalifiointiin eli tunnistukseen. Uusien psykoaktiivisten aineiden nopea tunnistus on tarpeellista monelta eri kannalta. Tarve tunnistukselle syntyy esimerkiksi erilaisten farmakologisten vaikutusten aiheuttamien myrkytystapausten seurauksena. Yhdisteet myös ilmaantuvat ja poistuvat huumekäytöstä nopeaan tahtiin, aiheuttaen siten tarpeen nopeille tunnistuksille. Yhdisteiden kvalifiointiin on kehitetty useita menetelmiä.¹⁴⁻¹⁶

Kvalitatiivinen analytiikka sisältää tuntemattomien yhdisteiden tunnistamisen näytteestä ja näiden yhdisteiden rakenteen selvittämisen.¹⁷ Tähän tarkoitukseen kehitetyt menetelmät eivät useimmiten kerro missä pitoisuuksissa yhdistettä näytteessä esiintyy, vaan mittauksen lopputuloksena saadaan positiivinen tai negatiivinen tulos. Todellisuudessa tuloksia on neljä, jotka voidaan nähdä taulukosta 1.

Tässä tutkielmassa käydään läpi erilaisia kvalitatiivisia menetelmiä, sillä niissä on huomattu viime vuosina puutoksia, joiden käsittely ja kehittäminen ovat ajankohtaisia.¹ Käytettyjä menetelmiä ovat kolorimetriset, immunokemialliset ja kromatografiset menetelmät.¹⁸

Taulukko 1. Yhdisteen kvalitatiivisen analyysin mahdolliset tulokset. On tärkeää muistaa väärän positiivisen tai negatiivisen tuloksen riskit.¹⁹

	Näyte sisältää yhdistettä	Näyte ei sisällä yhdistettä
Tunnistus	Oikea positiivinen tulos	Väärä positiivinen tulos
Ei tunnistusta	Väärä negatiivinen tulos	Oikea negatiivinen tulos

2.2.1. Näyttemateriaalin merkitys kvalitatiivisessa huumausaineanalytiikassa

Kvalitatiivista huumausaineanalytiikkaa voidaan toteuttaa laadultaan ja koostumukseltaan laajakirjoisesta joukosta näytteitä. Tutkittavana näytteenä voi olla esimerkiksi tabletti tai ihmisestä peräisin oleva eli endogeeninen näyte. Erilaiset näytteet ja niiden matriisit aiheuttavat etenkin esikäsittelymenetelmille haasteita. Jo ihmisistä peräisin olevien näytteiden välillä on suuria eroja, sillä kvalitatiivista analytiikkaa voidaan tehdä esimerkiksi veri-, virtsa-, plasma- tai hiusnäytteistä.²⁰

Tutkittavan näytteen laatuun ei voida aina laboratoriossa työskennellessä vaikuttaa, kuten esimerkiksi huumausaineiden takavarikoinneista peräisin olevissa näyte-erissä. Kuitenkin joissain tapauksissa, kuten ihmisestä peräisin olevissa näytteissä valikointi on mahdollista. Tällaisissa tapauksissa on vertailtava näyttemateriaalien erilaisia ominaisuuksia ja päädyttävä niiden perusteella sopivimpaan näytteeseen.

Ihmisestä saaduista näytteistä etenkin virtsanäytteet sopivat hyvin kvalitatiiviseen analyysiin niiden helpon näytteenottonsa ansiosta, korkeiden yhdistepitoisuuksien puolesta ja pitkän tunnistusaikaikkunan takia. Huomioon virtsan käytössä näyttemateriaalina on otettava tapaukset, joissa aineen käytöstä ei ole kulunut tarpeeksi aikaa. Tällöin yhdiste tai sen metaboliitit eivät ehdi erittyä elimistöstä virtsaan ja näin saadaan virheellisesti negatiivinen tulos. Toinen haaste virtsassa näyttemateriaalina on uusien psykoaktiivisten aineiden metaboliittien tunnistus, sillä aineiden metaboliaa kehossa ei useimmiten ole vielä ehditty tutkia.²⁰

2.2.2. Kolorimetrinen tunnistus

Kolorimetriset testit käyttävät yhdisteiden seulonnassa liuoksia värjääviä reagensseja. Tietty reagenssit reagoivat esimerkiksi synteettisten kannabinoidien indoli-rakenteeseen, jolloin mitatun absorbanssin perusteella voidaan todeta liuoksen sisältävän kannabista muistuttavaa yhdistettä. Ongelmana kannabinoidien tunnistamisessa kolorimetrisillä menetelmillä on niiden

vaatimat korkeat pitoisuudet ja puhtausluokat. Todellisuudessa näytteissä pitoisuudet ovat matalia ja yhdisteet esiintyvät seoksissa, joten esimerkiksi kannabinoideille kolorimetrinen tunnistus ei ole yleisesti käytössä. Myös katinoniyhdisteistä metyleenidioksisryhmän sisältäville yhdisteille on löydetty sopiva reagenssi, mutta samat ongelmat pitoisuuksien ja puhtausluokkien suhteen toistuvat.¹⁸ Kolorimetriset seulonnat saavat silti edelleen käytössä nopeutensa, siirreltävyytensä, hintansa ja näytteiden helpon esikäsittelyn vuoksi. Ne eivät myöskään vaadi paljoa osaamista henkilöstöltä ja ovat helppoja käyttää. Ne eivät kuitenkaan voi antaa tarkkaa tietoa molekyylin rakenteesta, ja voivat antaa väärän positiivisen tuloksen, mikäli näyte sisältää mitattavan yhdisteen kanssa hyvin samankaltaista ainetta.²¹

2.2.3. Immunokemiallinen tunnistus

Immunokemialliset testit käyttävät reagenssinaan vasta-aineita, jotka sitoutuvat mitattavaan yhdisteeseen. Sitoutuminen muutetaan mitattavaksi signaaliksi, esimerkiksi liuoksen värin muutoksen avulla. Tällaisessa tapauksessa immunokemiallinen testi voidaan luokitella myös kolorimetriseksi testiksi. Muita muuttuvia ominaisuuksia voi olla liuoksen fluoresenssi tai sähkökemialliset signaalit, kuten esimerkiksi johtokyky. Tunnetuin immunologinen seulontateknikka on entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).²²

Immunokemialliset testit voidaan jaotella kuoppalevyillä tehtäviin pikatesteihin ja suuriin automatisoituihin immunoanalytiikkaa suorittaviin laitteistoihin.²³ Pikatestejä käytetään etenkin sairaalalaboratorioissa niiden edullisen hintansa ja analyysin nopeuden vuoksi. Tällaiset pikatestit vaativat kuitenkin aina myös vahvistuksen esimerkiksi kromatografisilla menetelmillä. Testeillä on myös rajoitteita käytettävien vasta-aineiden takia. Vasta-aineiden täytyy olla tarpeeksi spesifisiä, jottei vääriä positiivisia tunnistuksia tule. Samalla läheisten rakenteiden tunnistaminen eli ristireaktiot voivat kuitenkin olla myös suotavia uusien psykoaktiivisten aineiden havaitsemiseksi. Myös yleistyneet yhdisteseokset voivat aiheuttaa immunokemiallisilla testeillä tilanteen, jossa vain toinen yhdiste seoksesta tunnistetaan positiivisesti.²¹

Uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistusta yhdisteryhmittäin immunokemiallisilla menetelmillä on tutkittu moneen eri otteeseen. Tunnistamisten välillä on huomattu olevan

suuria eroja. Erot syntyvät eri yhdisteryhmien, testien sekä yksittäisten yhdisteiden välille.²⁴⁻²⁶ Synteettisten kannabinoidien tunnistuksessa esimerkiksi ELISA ei anna luotettavaa tunnistusta, mutta fentanyyli johdannaisien tutkimuksissa on saatu parempia tuloksia. Testit voivat siis toimia tietyille yhdisteryhmille tai yksittäisille yhdisteille yhdisteryhmien sisällä, mutta kattavaksi seulontamenetelmiksi niistä ei tämänhetkisten tietojen mukaan ole.²⁷

2.2.4. Kaasukromatografi-massaspektrometria

Kromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmässä yhdisteet erottuvat ensin fysikaalisten ominaisuuksiensa mukaan kromatografissa, josta ne siirtyvät massaspektrometrille detektointia varten. Kaasukromatografille on ominaista, että näyte on jo ennen kolonnia tai viimeistään kolonnissa saatettu kaasufaasiin. Liuottimia ei siis tarvita, kun näyte kulkee kantajakaasun avulla kolonnia eteenpäin. Massaspektrometrissa yhdisteet erotetaan puolestaan niiden massa-varaussuhteen eli m/z -arvon perusteella. Erotus tapahtuu esimerkiksi kvadrupolin avulla, joka muuttuvan sähkökentän avulla ohjaa detektorille ainoastaan tietyn m/z -arvon omaavat molekyylit.

Kyseistä kaasukromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmää (GC-MS) voidaan hyödyntää psykoaktiivisten aineiden tunnistuksessa.²⁸ Tunnistuksessa voidaan myös hyödyntää esimerkiksi kaasukromatografian parina tandem-massaspektrometriaa (GC-MS/MS).²⁹ Tandem-massaspektrometrissa yhdistyvät esimerkiksi kolme kvadrupolia (QqQ). Näistä kvadrupoleista ensimmäinen toimii ioninohjaimena, toinen massojen suodattajana ja kolmas törmäyskammiona. Törmäyskammiossa ionit käyvät läpi fragmentoitumista törmätessään neutraaleihin kaasumolekyyleihin. Törmäyskaasuna käytetään useimmiten typpeä.³⁰

GC-MS yhdistelmän heikkoutena on kaasukromatografian rajautunut analyttivalikoima. Tunnistaminen GC-MS-laitteistoilla on mahdollista vain haihtuville yhdisteille. Huonosti haihtuville yhdisteille mahdollisuutena on yhdisteiden johdoksenmuodostus (derivatisointi) haihtuvampaan muotoon. GC-MS-analyysistä saatavia spektrejä voidaan verrata spektrikirjastoihin ja tehdä vertailun perusteella luotettava tunnistus. Tämä on hyväksytty tapa tunnistaa yhdiste, sillä eri laitteistoista saatavat spektrit ovat vertailukelpoisia.

Vertailukelpoisuus johtuu GC-MS yhdistelmässä käytettävästä ionilähteestä. Ionilähteenä on useimmiten elektroni-ionisaatio (EI), joka luo toistettavan yhdistespektrin.¹⁹

Käytössä olevat GC-MS-tietokannat ovat vuosien saatossa kasvaneet laajoiksi tietopankeiksi, jotka päivittyvät jatkuvasti. Spektrihaut antavat tuloksena yhtäläisyyskertoimen parhaan tunnistuksen kanssa. Hakujen puutteena on kuitenkin ollut tunnistuksen luotettavuuskerroin, jonka määrittäminen on tuottanut ongelmia eikä yleistä laskentatapaa ole päätetty. Taulukossa 2 on lueteltu virhelähteitä, jotka vaikuttavat luotettavuuskertoimeen ja saattavat johtaa vääriin negatiivisiin tuloksiin. Taulukko 3 puolestaan luettelee virhelähteitä, jotka voivat johtaa vääriin positiivisiin tunnistuksiin. Taulukoista nähdään, että etenkin isomeerit aiheuttavat yhdisteiden tunnistuksen ongelmia. Samankaltaiset isomeerirakenteet voivat tuottaa vääriä positiivisia tunnistuksia läheisen spektrin takia. Isomeereistä erityisesti aromaattiset paikkaisomeerit ovat ryhmä, joiden tunnistus on hankalaa.¹⁹

Taulukko 2. GC-MS-spektrissä esiintyviä variaatioita jotka aiheuttavat väärän negatiivisen riskin. Yhdisteen prekursorilla tarkoitetaan valitun m/z-arvon omaavaa yhdistettä, joka nähdään MS-spektrissä.¹⁹

Muutos	Luokka	Syy
väärä piikki	kontaminaatio	retentioajasta johtuva
	tausta/kohina	ionisaatiossa tapahtuva/ kantajakaasun kontaminaatio
	piikkien jakautuminen/yhdistyminen	ongelmat resoluutiossa
matala konsentraatio (signaali/kohina suhde matala)	vaihtuva intensiteetti	virheet ionien mittauksissa
	puuttuvat piikit	huono signaali
	väärien piikkien riski	kohina
energian variaatio	terminen (elektroni-ionisaatio, EI)	terminen energia prekursorissa aiheuttaa lisää fragmentoitumista
	törmäysenergia	virityksen/ionien optiikkaongelma
isomerisaatio	näytteessä tapahtuva	tapahtuu ennen injeksiota
	hajoaminen ionilähteessä	tapahtuu kuuman ionisaattorin pinnalla
	adduktit	adduktien synty
laitteisto	intensiteetin saturaatio	liian korkea konsentraatio

Taulukko 3. GC-MS-spektrissä esiintyviä variaatioita jotka aiheuttavat väärän positiivisen riskin.¹⁹

Muutos	Luokka	Syy
tieto rakenteesta kadotetaan fragmentoitumisessa	tunnistus	tietyillä yhdisteillä samoja ryhmiä, jotka aiheuttavat samanlaisia fragmentteja
	ei prekursorin piikkiä (GC-EI/MS)	epästabiili molekyyli
	yksi dominoiva fragmenttipiikki	yksi sidos selvästi muita heikompi
satunnainen tunnistus	erilaiset yhdisteet joilla samanlainen spektri	harvinainen hyvälaatuisilla spektreillä joissa enemmän kuin yksi piikki
identtinen MS tunnistus	optiset isomeerit	amat fragmentointienergiat
	seos jossa kemiallinen tasapaino	tautomeerit, konformeerit
samanlaiset sidosrakenteet	diastereomeerit, cis/trans-isomeria, konformeerit	läheiset rakenteet
isomeerit joilla vain vähän eroja fragmentaatiossa	aromaattiset paikkaisomeerit	fragmentit eivät paljasta sidosrakennetta
epävarma rakennekaava kirjastossa	liittyneen ryhmän, saturaation tai stereoisomerian arvailut	rakenteen yksityiskohtia ei tiedetä varmuudella ja niiden vaikutuksia ei tiedetä spektriin

Kaasukromatografian vahvuudet seulonnassa ovat toistettavat spektrit, jotka mahdollistavat niiden vertailun ja laajan tietokannan toteuttamisen. Kuten mainittu, toistettavat spektrit saadaan käytettäessä ionilähteenä elektroni-ionisaatiota. Suurin rajoite laitteistolla on sen vaatimukset analyttien haihtuvuudesta ja termisestä stabiiliudesta. Huonosti haihtuvien ja termisesti epästabiilien yhdisteiden tunnistukseen on olemassa vaihtoehtoisesti nestekromatografia, joka voidaan myös yhdistää massaspektrometriaan.

2.2.5. Nestekromatografia-massaspektrometria

Nestekromatografian ja massaspektrometrian yhdistelmässä (LC-MS) näyte on kolonnissa nestefaasissa. Liikkuvana faasina nestekromatografiassa käytetään liuottimia, jotka liikuttavat tutkittavia yhdisteitä pitkin kolonnia kohti massaspektrometria. Siirrettäessä yhdiste ja liikkuva faasi massaspektrometriin detektointia varten ne on saatava pois nestefaasista. Tätä varten LC-MS-yhdistelmissä käytetään useimmiten eri ionilähteitä kuin GC-MS. LC-MS-laitteiston ionilähteenä toimii esimerkiksi sähkösumutus-ionisaatio (ESI). ESI on selvästi GC:n käyttämää elektroni-ionisaatiota pehmeämpi ionisaatiomenetelmä, joka aiheuttaa molekyyleille vain vähän fragmentaatiota.²⁹ Koska se ei juurikaan fragmentoi yhdisteitä, LC-MS-laitteistoista saatava data kertoo ainoastaan protonoidun tai deprotonoidun molekyyli-ionin eli prekursorin m/z -arvon.³¹ Tämä tieto yksinään ei riitä uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistukseen.

Koska GC-MS tai LC-MS eivät sellaisinaan toimi kokonaisvaltaisina ratkaisuina yhdisteiden tunnistamiselle, tarkastellaan lisää massaspektrometrian erilaisia sovelluksia. Kaasukromatografian suppeampien tunnistusmahdollisuuksien vuoksi katsauksessa keskitytään tarkemmin vain nestekromatografiassa hyödynnettäviin massaspektrometriyhdistelmiin. Nämä tarkoittavat nestekromatografisessa analytiikassa pääosin LC-MS/MS- tai yhdisteiden korkeampaan erotuskykyyn kykeneviä massaspektrometrilaitteistoja.³² Näihin korkeampaan erotuskykyyn kykeneviin massaspektrometreihin yhdistetään usein korkean erotuskyvyn nestekromatografi (UHPLC) tavallisen LC:n sijasta sen tuottaman korkeamman resoluution ja lyhyempien analyysiaikojen takia.

2.2.6. Massaspektrometria

Tässä kappaleessa käsitellään erilaisten massaspektrometrien käyttöä uusien psykoaktiivisten aineiden seulonnassa. Kuten aiemmin todettu, käyttö toksikologisissa analyyseissä on yleistä etenkin kromatografiaan liitettynä. Kaasukromatografiassa seulontaan on käytössä sekä yksittäisiä kvadrupoleja (MS) että esimerkiksi monta kvadrupolia (MS/MS) sisältäviä laitteistoja. Nestekromatografiassa esimerkiksi kolmoiskvadrupoli (engl. triple quadrupole,

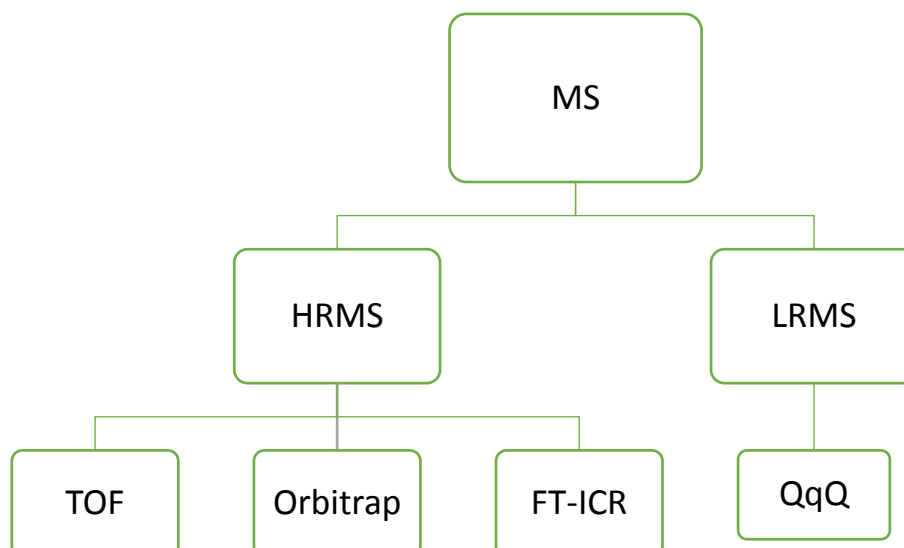
QqQ), lentoaika-analysaattori (engl. time of flight, TOF) tai kvadrupoli-lentoaika-analysaattorit (QTOF) ovat yleisiä tässä tarkoituksessa.³³

Käytettävät massaspektrometrit voidaan jakaa matalan erotuskyvyn (engl. low-resolution mass spectrometry, LRMS) ja korkean erotuskyvyn laitteistoihin (engl. high-resolution mass spectrometry, HRMS). Erotuskyky kuvaa massaspektrometrin kykyä erottaa ioneja, joilla on läheiset m/z -arvot eli saavuttaa tietty resoluutio. Matalan erotuskyvyn MS/MS-laitteistot koostuvat esimerkiksi monista kvadrupolista. Korkean erotuskyvyn laitteistot perustuvat TOF-, orbitrap-, tai Fourier-ionisyklotroniresonanssitekнологiaan (engl. fourier-transform ion cyclotron resonance, FT-ICR). Näillä HRMS-laitteistoilla erotuskykyä kuvataan puolikorkeuden leveydellä (engl. full width at half maximum, FWHM), joka määritellään kaavan 1 mukaan. Kaavassa m kuvaa tutkitun yhdisteen m/z -arvoa ja Δm tarkoittaa mitattujen m/z -arvojen jakaumaa piikin intensiteetin puolivälistä mitattuna.³⁴ Laitteistoja voidaan vertailla FWHM arvon avulla. Mitä korkeampaan arvoon päästään, sitä parempi resoluutio laitteistolla on. Korkean erotuskyvyn laitteistoilla päästään rutiinianalytiikassa 30 000 FWHM mittauksiin.³⁵

$$FWHM = \frac{m}{\Delta m} \quad [1]$$

Massatarkkuudella tarkoitetaan tutkittujen yhdisteiden tarkkojen massojen ja mitattujen massojen erotusta. Yhdisteen tarkka massa lasketaan käyttäen hyväksi molekyylikaavaa, isotooppijakaumaa ja varausta. Yhdisteiden tunnistamisen kannalta massatarkkuuden on oltava mahdollisimman pieni. Massatarkkuus voidaan esittää esimerkiksi yksiköissä ppm tai Da. Nykyisillä HRMS tekniikoilla 2 ppm massatarkkuutta voidaan pitää hyvänä.³⁶ Kuvasta 4 nähdään massaspektrometrian jakautuminen osa-alueisiin. HRMS ja LRMS eroavat käytännössä etenkin resoluution ja massatarkkuuden puolesta.³⁷

Massaspektrometrusten mittauksien avulla voidaan myös tutkia yhdisteiden suhteellisia isotooppijakaumia. Isotooppijakaumalla kuvataan samaan kemialliseen rakenteeseen liittyvien isotooppiikkien runsauksien suhdetta. Suhteellisen isotooppijakauman yksikkönä toimii Sigma.



Kuva 4. Massaspektrometria jakautuu korkean- ja matalan erotuskyvyn massaspektrometriaan. Esimerkkeinä korkean erotuskyvyn laitteistoista TOF, Orbitrap ja FT-ICR. Esimerkkinä matalan erotuskyvyn laitteistosta yleisimmin käytetty QqQ MS/MS-laitteisto.³⁸

Spektrometrien yleiset käyttötarkoitukset eroavat toisistaan. LRMS QqQ-spektrometreja on hyödynnetty enimmäkseen jo tunnettujen prekursorien ja fragmenttien tarkasteluun. Tunnettuja prekursoreja ja fragmentteja voidaan hyödyntää esimerkiksi useiden reaktioiden seurantaan perustuvassa tekniikassa. Seuranta mahdollistaa esimerkiksi tiettyjen yhdisteryhmien seulonnan.³⁹ Myös toimivia monia yhdisteryhmiä yhdisteleviä seulontamenetelmiä on kehitetty tälle tekniikalle.⁴⁰ Tekniikka vaatii kuitenkin, että etsittävä analyytti tunnetaan jo ennen analyysin suorittamista, jotta yhdisteen fragmentointi voidaan optimoida. Menetelmä ei siis toimi tuntemattomien yhdisteiden seulonnassa. Sen lisäksi tunnetut uudet aineet pitää viedä jo olemassa oleviin menetelmiin ja validoida vertailuaineilla, mikä LRMS-laitteistoilla vie aikaa. Koska uusia aineita ilmaantuu huumeikäyttöön jatkuvasti, pitää nämä seikat huomioida laitteiston valinnassa.³³

Vaihtoehto näille laitteistoille on löydetty HRMS puolelta. HRMS-laitteistot mahdollistavat ei-kohdennetut mittaukset, joista saadaan sekä MS-spektrit että MS/MS-spektrit halutulle massa-alueelle. HRMS-laitteistot hyödyntävät esimerkiksi kvadrupoleja tai heksapoleja luodessaan MS/MS-dataa. Tyypillisesti tämä tarkoittaa kvadrupolien ja heksapolien yhdistelmää, joka sisältää sekä ioninohjaimen että törmäyskammion. HRMS laitteistoissa uusia yhdisteitä ei tarvitse lisätä seulonnan menetelmiin. Suuri määrä dataa mahdollistaa myös datan uudelleen käsittelyn. HRMS-laitteistojen suosiota rajoittaa laitteistojen suurempi hinta ja niiden luoma datan suuri määrä, joka vaatii tehokkaat tietokoneet.⁴¹

HRMS-laitteistoista TOF-laitteistoissa ionit saadaan erotettua niiden lentoaikojen perusteella. Laitteistoissa ionit saadaan liikkeelle staattisen sähkökentän avulla, jonka jälkeen ionit matkaavat annettua reittiä. Ionin massa-varaussuhde tunnistetaan detektorilla sen kulkeman reitin ja siihen kuluneen ajan avulla. Näillä korkean erotuskyvyn TOF-laitteistoilla suorituskky ei riipu datan keräykseen käytetystä ajasta, joten UHPLC:n yhdistäminen siihen sopii hyvin.⁴² Käytettäessä UHPLC-QTOF-yhdistelmää saadaan nopeita ajoja, hyvä herkkyys, korkea resoluutio ja erinomainen massatarkkuus.⁴³ Tämä tarkoittaa näillä laitteistoilla QTOF-massaspektrometrin ansiosta alle 1 ppm massatarkkuutta ja >40 000 FWHM erotuskykyä m/z -arvon ollessa 900.⁴⁴

Orbitrap-laitteiston toimintaperiaate perustuu ionien harmonisiin oskillaatioihin staattisessa sähkökentässä niiden m/z -arvolle ominaisella taajuudella. Nämä laitteistot saavuttavat erittäin korkean massatarkkuuden (<1 ppm) ja erotuskyvyn (240 000 FWHM asti m/z -arvon ollessa 400). Orbitrap-laitteistojen heikkous on kuitenkin niiden erotuskyvyn ja datan keräysajan välinen yhteys. Korkea erotuskyky vaatii orbitrap-laitteistolta paljon aikaa, joten ne eivät sovellu nopeisiin UHPLC-erotuksiin. Mikäli UHPLC ja orbitrap yhdistetään, erotuskyky laskee huomattavasti (~18 000 FWHM). Tavallista nestekromatografiaa käytettäessä puolestaan kromatografinen resoluutio kärsii ja analyysiajat pitenevät. Nämä ovat ei-toivottuja ominaisuuksia huumausaineanalytiikassa.⁴⁵

FT-ICR perustuu varauksellisten ionien pyörivään oskillaatioon magneettikentässä niiden m/z -arvolle ominaisella syklotronitaajuudella. Tästä liikkeestä saadusta signaalista muunnetaan massaspektri.⁴⁶ FT-ICR-laitteiston massatarkkuus (<1 ppm) ja erotuskyky (2 700 000 FWHM m/z -arvon ollessa 400) ovat erinomaisia.⁴⁷ Tästä huolimatta niiden käyttö on edelleen vähäistä MS/MS- ja TOF-laitteistoihin verrattuna huumausaineanalytiikassa sillä ne vaativat kokeneen käyttäjän ja ovat kalliita.¹

Taulukosta 4 nähdään esimerkkinä erilaisia MS-, MS/MS- ja QTOF-spektrometreille luotuja seulontamenetelmiä. Valitut menetelmät havainnollistavat laitteistojen toimintaa huumausaineanalytiikassa, mutta ovat vain pieni otanta mahdollisista olemassa olevista menetelmistä. Taulukosta nähdään GC-MS:n tapauksessa synteettisten kannabinoidien puuttuminen seulontamenetelmistä. Tämän johtuu synteettisten kannabinoidien huonosta haihtuvuudesta, mikä tekee niistä epäsoivia kaasukromatografiaan ilman derivatisointia. LC-MS/MS ja UHPLC-QTOF menetelmistä nähdään, että monien ja hyvin erilaisten

yhdisteryhmien samanaikainen seulonta on mahdollista. Tunnistusrajat vaihtelevat yksittäisten yhdisteiden kohdalla paljon, mutta menetelmien väleillä ei ole suurta eroa.

Taulukko 4. Uusien psykoaktiivisten yhdisteiden tutkimusta erilaisilla massaspektrometreilla.

GC-MS							
Viite	Synteettiset kannabinoidit	Fentanyyli- / amfetamiini-johdannaiset	Katinoni-johdannaiset	Muut	Matriisi	Esikäsittely-menetelmä	Tunnistuksen raja (µg/l)
48	0	16	3	4	veri + virtsa	kiinteäfaasi-uutto	0,2-1,0
49	0	14	8	4	veri + virtsa	dispersiivinen neste-neste-mikrouutto	1,0-10
LC-MS/MS							
Viite	Synteettiset kannabinoidit	Fentanyyli- / amfetamiini-johdannaiset	Katinoni-johdannaiset	Muut	Matriisi	Esikäsittely-menetelmä	Tunnistuksen raja (µg/l)
50	0	38	27	9	seerumi	kiinteäfaasi-uutto	0,2-4,0 (62 analyytillle)
51	28	10	19	12	veri	proteiinien saostaminen asetonitrilillä	0,1-0,5
UHPLC-QTOF							
Viite	Synteettiset kannabinoidit	Fentanyyli- / amfetamiini-johdannaiset	Katinoni-johdannaiset	Muut	Matriisi	Esikäsittely-menetelmä	Tunnistuksen raja (µg/l)
52	47	0	0	0	virtsa	kiinteä-nesteuutto	0,25-5 (45 analyytillle)
53	55	2	12	6	virtsa	kiinteäfaasi-uutto	0,2-60

Taulukossa 5 on kuvattu vertailtujen laitteiden ominaisuuksia. Vertailun tuloksena voidaan todeta QTOF- ja FT-ICR-laitteistojen olevan uusien psykoaktiivisten aineiden seulonnassa tällä hetkellä lupaavimmat vaihtoehdot. Myös MS/MS-yhdistelmä on käytössä, vaikka uusien aineiden lisäyksen työläys rajoittaakin käytettävyyttä. FT-ICR puolestaan on vielä hintansa ja vaativuutensa puolesta suhteellisen vähäisessä käytössä, joten tutkielmassa keskitytään ajankohtaiseen QTOF-laitteistoon tarkemmin.

Taulukko 5. Erilaisten massaspektrometrien hyvät ja huonot puolet uusien psykoaktiivisten aineiden seulonnassa.

Osa-alue	MS	MS/MS	QTOF	Orbitrap	FT-ICR
Käytettävyys	+	-	+	+	-
Spektrien toistettavuus*	+	+	-	-	-
Datan määrä yhdistettäessä LC	-	+	+	+	+
Retrospektiivinen datan käsittely	-	-	+	+	+
Sopii sekä LC että UHPLC	+	+	+	-	+
Massatarkkuus	-	+	+	+	++
Erotuskyky	-	+	+	+	++
Hinta	+	+	+	+	-
*Toistettavuus riippuu käytetystä ionilähteestä					

2.3. Kvadrupoli-lentoaika – analysaattorilla tehtävät mittaukset

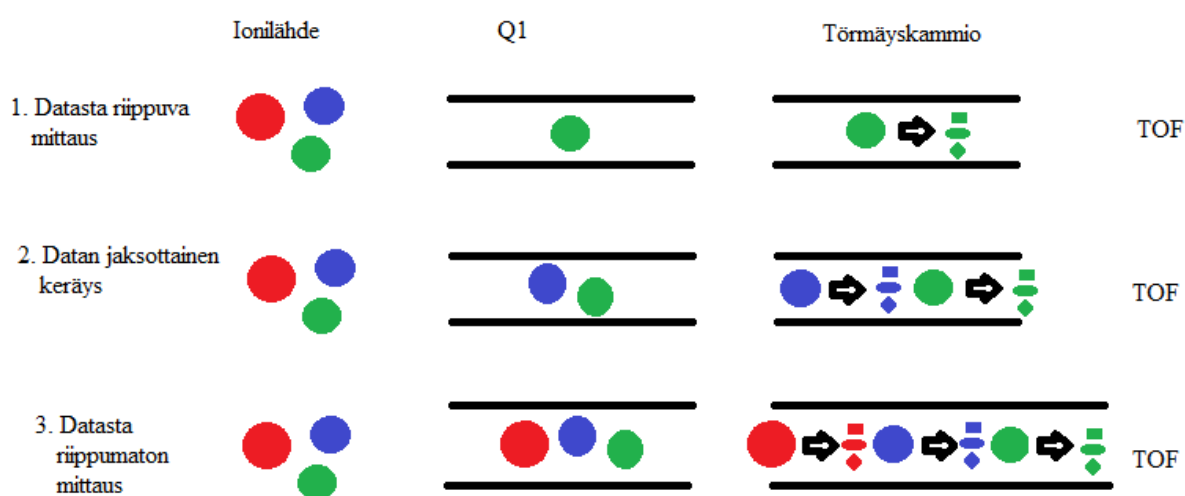
QTOF-laitteiston toimintaa voi yksinkertaisimmillaan verrata kolmoiskvadrupoliin, jossa viimeinen kvadrupoli on korvattu TOF-analysaattorilla. Kvadrupoleista ensimmäinen toimii ioninohjaimena. Kvadrupolista ionit siirtyvät törmäyskammioon, joten törmäyskammiossa on kerrallaan ainoastaan halutun m/z -arvon omaavia prekursoreita. Törmäyskammiona voi toimia toinen kvadrupoli tai esimerkiksi heksapoli. Myös ennen ensimmäistä ioninohjaimena toimivaa kvadrupolia voi sijaita kolmas (Q0) kvadrupoli tai heksapoli, joka vähentää saapuvien ionien oskillaatioita. Törmäyskammiossa ionit käyvät läpi fragmentaatiota (engl. collision induced dissociation, CID), joka saadaan aikaan törmäyksillä neutraalien kaasumolekyylien kanssa.⁵⁴

Kuvasta 5 nähdään ensimmäisen kvadrupolin mahdollistamia eri tilanteita QTOF-laitteistolla. Datasta riippuvan mittauksen tapauksessa ensimmäisessä kvadrupolissa tapahtuu tarkka massa-alueen raja. Datasta riippumattomiin mittauksiin kuuluva datan jaksottainen keräys päästää hieman laajemman massa-alueen prekursorit törmäyskammioon kerrallaan, mutta ei kaikkia. Tämä mittaus kuuluu silti datasta riippumattomiin mittauksiin, sillä sen avulla saadaan halutun alueen MS- ja MS/MS-spektrit. Kolmas vaihtoehto on kokonaan datasta riippumaton mittaus, jolloin kvadrupoli päästää kaikki mitattavan massa-alueen prekursorit törmäyskammioon samaan aikaan. Näitä menetelmiä kutsutaan kohdennetuiksi tai kohdentamattomiksi.

Datasta riippuvainen mittaus voidaan kuvatus manuaalisen prekursorivalinnan lisäksi suorittaa automatisoidulla prekursorivalinnalla. Automatisoidussa prekursorivalinnassa laitteisto valitsee runsaimmat prekursori-ionit, ja suorittaa niille fragmentoinnin. Mittauksen tuloksena saadaan näytteen runsaimmille yhdisteille sekä MS- että MS/MS-spektrit, mutta mikäli yhdisteitä halutaan mitata pienemmillä konsentraatioilla, täytyy suorittaa lisämittauksia. Datasta riippuvainen mittaus tuottaa laadukkaan spektrin, mutta kuten MS/MS-laitteistot se vaatii yhdisteiden tuntemisen ja viemisen menetelmään etukäteen niiden tunnistamiseksi ja fragmentoinnin optimoimiseksi.⁵⁵

Datasta riippumattomat mittaukset jaetaan datan jaksottaiseen keräykseen ja kokonaan datasta riippumattomaan mittaukseen. Datan jaksottainen keräys mittaa massaspektrometriin tulevien prekursori-ionien fragmentointia yksi massa-alueen osa kerrallaan. Koko massa-alue saadaan lopulta monen mittauksen yhdistelmänä.⁵⁶ Datasta kokonaan riippumattomat mittaukset vievät puolestaan törmäyskammioon kerralla kaikki prekursori-ionit. Tätä kutsutaan laaja-alaiseksi

törmäysten aiheuttamaksi pilkkomiseksi (engl. broadband collision-induced dissociation, bbCID), ja se tuottaa epäselektiivisen ja laaja-alaisen bbCID-spektrin. Datasta riippumattomat mittaukset on todettu herkiksi ja tarkoiksi tekniikoiksi, joilla useampien yhdisteiden tunnistaminen pienilläkin pitoisuuksilla onnistuu. Sen lisäksi läheisesti tai yhtäaikaaisesti eluoituvat yhdisteet erotetaan paremmin toisistaan datasta riippumattomien kuin riippuvien mittausten avulla.⁵⁷ Datasta riippumattomien menetelmien heikkous on hidas datankäsittely. Monimutkainen datankäsittely johtuu suuresta määrästä dataa, jota datasta riippumaton mittaustallentaa koko massa-alueen verran sekä MS- että MS/MS-muodossa.



Kuva 5. Erilaiset mittaustekniikat QTOF-laitteistossa. Piirretty lähteen³⁰ kuvan perusteella.

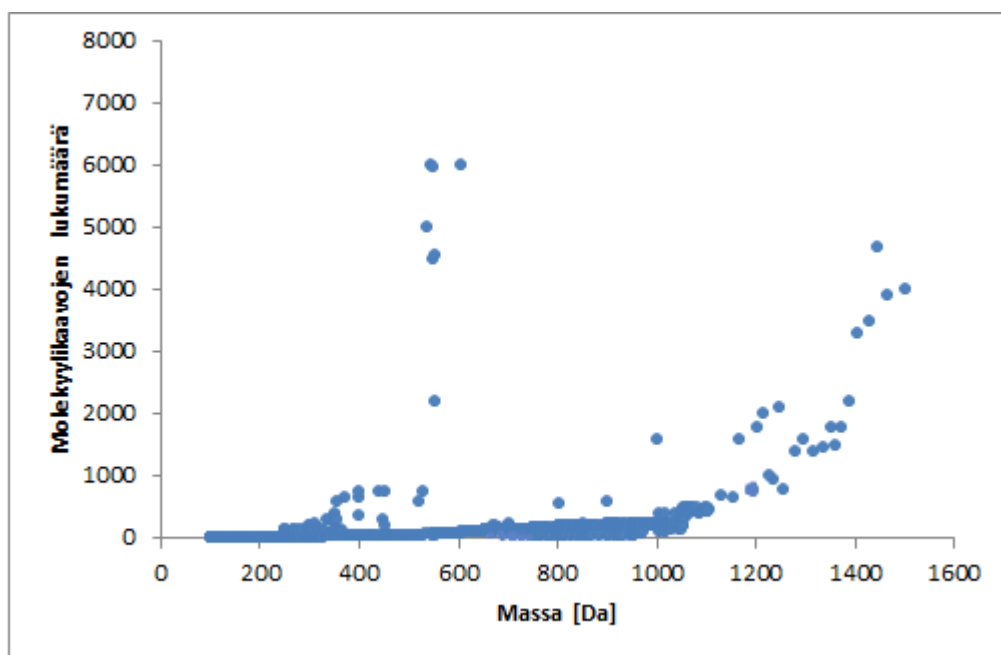
Kvadrupolissa tai heksapolissa fragmentoituneet ionit viedään TOF-laitteistoon. Laitteistossa ionit lähetetään liikkeelle pulsseissa sähkökentän avulla. Kaikille ioneille annetaan alussa samanlainen potentiaalienergia, mutta yhdisteiden massa ja varaus vaikuttavat siihen kuinka nopeasti ne saapuvat detektorille. Pienillä molekyyileillä varaukset ovat usein -1 tai +1, riippuen siitä onko käytössä positiivinen vai negatiivinen ionisaatiotekniikka. Tällöin ainoastaan massalla on vaikutusta. TOF-laitteistot käyttävät ioniheijastinta vähentämään systemaattisia virheitä. Ioniheijastin heijastaa sitä kohti lentävät ionit detektorille tasoittaen ionipulssissa sattuneita mahdollisia energiaeroja.⁵⁸

2.3.1. Yhdisteiden fragmentoituminen laitteistossa

QTOF-laitteistossa näytteensyöttö tapahtuu esimerkiksi sähkösumutusionisaation avulla, etenkin mikäli se on yhdistetty UHPLC-laitteistoon. Tämän jälkeen datasta riippumattomissa mittauksissa mitataan näytteen MS- ja MS/MS-spektrit. Mittaukset tapahtuvat sykleissä, jossa yhdisteet kulkevat ensin kvadrupolin ja törmäyskammion läpi ilman fragmentoitumista TOF-laitteistoon. Näin saadaan MS-spektri. MS-spektristä valituille ioneille saadaan MS/MS-spektri lisäämällä törmäyskammioon törmäyskaasua, jolloin siellä tapahtuu yhdisteiden fragmentoituminen.⁵⁵ Fragmentoitumisen voimakkuus riippuu törmäyskammiossa käytetyn jännitteen voimakkuudesta ja siitä aiheutuvan molekyylien törmäysenergian suuruudesta. Sähkökentässä molekyylit törmäävät neutraaleihin kaasumolekyyleihin ja pilkkoutuvat törmäyksen seurauksena kullekin molekyylille ominaisella tavalla. Fragmentoituminen riippuu myös siitä, onko sähkösumutusionisaation sähkökentässä käytössä positiivinen vai negatiivinen ionisaatiomenetelmä.⁵⁹

2.4. Tunnistus datankäsittelyohjelmien avulla

Yhdisteiden ja niiden fragmenttien tunnistaminen ilman datankäsittelyohjelmia manuaalisesti on hankalaa ja aikaa vievää, eli usein mahdotonta käytettävissä olevilla resursseilla. Datan prosessoinnin tärkeys korostuu molekyylin massan kasvaessa, sillä moolimassan kasvaessa mahdollisten molekyylikaavojen lukumäärä kasvaa eksponentiaalisesti kuvan 6 mukaan.



Kuva 6. Laskennallisesti mahdollisten molekyylikaavojen lukumäärä satunnaisesti valituille molekyyleille 3 ppm massatarkkuudella ja $\pm 5\%$ isotooppijakauman sallitulla virheellä. Piirretty lähteessä⁶⁰ esiintyvän kuvan perusteella.

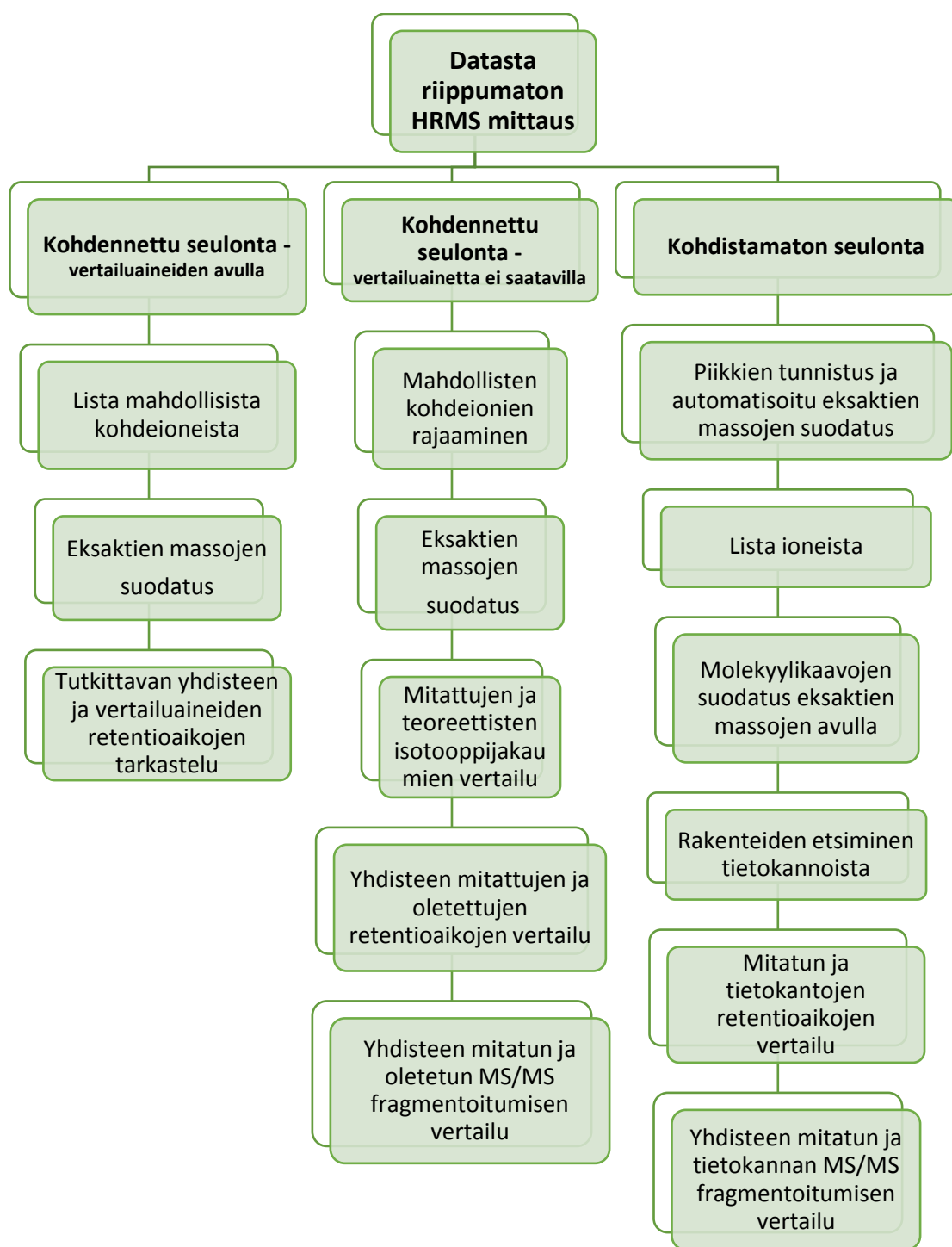
HRMS-laitteistojen datasta riippumaton mittaus mahdollistaa datan retrospektiivisen tarkastelun. Tällä tarkoitetaan sitä, että mittaus mahdollistaa tuntemattomien yhdisteiden tutkimisen jälkeenpäin spektristä tarkastellulta massa-alueelta. Eri laitteilla tuotetun datan välistä vertailua vaikeuttaa kuitenkin eri laitteistojen tuottamien spektrien väliset suuret erot. Tämä on johtanut tilanteeseen, ettei ole olemassa laajaa yleisesti käytössä olevaa HRMS-spektritietokantaa, vaan tietokannat ovat usein laboratorioiden yksityisessä käytössä olevia. Yksityisten tietokantojen päivitykset riippuvat uusien psykoaktiivisten aineiden

vertailuaineiden saatavuudesta. Mikäli vertailuainetta ei ole saatavilla, ainetta ei voida lisätä tietokantaan ja näin ollen väärin negatiivisten tulosten riski kasvaa.

Suppeiden tietokantojen luomien tunnistusongelmien takia on tuntemattomien yhdisteiden tunnistamiselle viime aikoina etsitty vaihtoehtoa datankäsittelyohjelmien ja entistä laajempien julkisten tietokantojen saralta. Tämä johtuu siitä, että tuntemattomien yhdisteiden tutkimuksissa ei voida aluksi hyödyntää vertailuaineita. Siksi on lähdettävä aluksi liikkeelle datankäsittelyohjelmien avulla, jonka jälkeen mahdolliset tunnistukset varmistetaan vertailuaineita hyödyntäen.⁶¹ Tällaisessa datankäsittelyyn pohjautuvassa tunnistuksessa HRMS-laitteistojen mahdollistama retrospektiivinen datankäsittely on avainasemassa. Kuva 7 esittelee, kuinka yhdisteiden tutkimus eroaa tunnettujen ja tuntemattomien yhdisteiden kohdalla ja kuinka vertailuaineet vaikuttavat prosessiin.

Tuntemattomien yhdisteiden tutkimisessa datankäsittelyohjelmien avulla voidaan hyödyntää datasta riippumatonta mittauksia esimerkiksi valitsemalla spektristä runsaimmat spektriipiikit läheisempään tarkasteluun. Spektriipiikkien valitsemisen jälkeen selvitetään piikkiä vastaava molekyylikaava prekursori-ionin avulla. Vaihtoehtoisesti voidaan datankäsittely tehdä käyttäen hyväksi tunnettuja kemiallisille ryhmille ominaisia fragmentoitumisominaisuuksia. Massaspektristä saatavia tietoja, kuten esimerkiksi ryhmälle ominaisia lohkeamia tai fragmentteja käytetään hyväksi. Kun analysoitavat piikit valitaan käyttäen hyväksi tietoa jonkin kemiallisen ryhmän fragmentoitumisesta, voidaan vähentää turhien piikkien analysointia.⁶¹

Uusien psykoaktiivisten aineiden tapauksessa täytyy seulonnassa ottaa myös huomioon näyttematriisien aiheuttamat vaihtelut analyysiin. Esimerkiksi seulottaessa virtsanäytteistä uusia psykoaktiivisia aineita täytyy datankäsittelyä suorittaessa ottaa huomioon myös mahdolliset metaboliitit. Toisin kuin voisi olettaa, eivät positiiviset näytteet aina sisällä yhdistettä sen alkuperäisessä muodossa. Mikäli kuitenkin tunnistetaan aineiden tunnettuja ja niille ominaisia metaboliitteja, voidaan katsoa tunnistuksen olevan positiivinen. Tämä tuottaa etenkin uusien psykoaktiivisten aineiden kohdalla ongelmia, sillä huumeikäyttöön äskettäin tulleille yhdisteille ei useimmiten vielä löydy metaboliittien vertailuaineita. Myös tähän tarkoitukseen on kehitetty datankäsittelyohjelmia ja työkaluja, joilla molekyylien metaboliaa voidaan tutkia.⁶²



Kuva 7. Kaaviokuva esittää kohdennetun ja kohdistamattoman seulonnan erot datan käsittelyssä. Kohdennetun seulonnan tulokset johtavat joko tunnistetun yhdisteen kvantifointiin tai listaan yhdisteistä joita näytteessä luultavasti esiintyy. Kohdistamattomassa data-analyysissä päädytään listaan yhdisteistä, joita näytteessä luultavasti esiintyy. Kaaviokuva on piirretty lähteiden^{63,61} perusteella.

3. KOKEELLINEN OSA

3.1. Johdanto

Pro Gradu tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) oikeustoksikologian laboratoriossa. THL:n oikeustoksikologiayksikkö arvioi, kehittää ja tuottaa oikeustoksikologian ja päihdetestauksen piiriin kuuluvia tutkimuksia. Laboratoriossa tehtävä huume- ja lääkeaineseulonta suoritetaan UHPLC-QTOF-laitteiston avulla virtsasta. Laitteistolla saavutetaan vaadittu erotuskyky ja yhdestä mittauksesta saatava data mahdollistaa datan uudelleenprosessoinnin, jolloin lisämittauksilta vältytään.

Työn ensimmäisen osan tavoitteena oli karakterisoida ja lisätä 56 yhdistettä laboratorion UHPLC-QTOF-tietokantaan vertailuaineiden avulla. Yhdisteille tunnistettiin yleisimmät fragmentit sekä näiden bruttokaavat ja ionisuhteet. Toisessa osassa tutkittiin m/zCloud (HighChem LLC, Slovakia) tietokannan sovellettavuutta tuntemattomien yhdisteiden alustavaan identifiointiin ilman vertailuainetta.

Perinteisesti uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistus laboratorioissa on suoritettu vertailuaineiden avulla. Tämä on yleisesti hyväksytty ja varma tapa tunnistaa yhdiste. Vertailuaineiden löytäminen voi olla kuitenkin suuri haaste tunnistuksien tekemisessä. Tämä johtuu uusien psykoaktiivisten aineiden nopeasta ilmaantumisesta ja vaihtuvuudesta. Uusien psykoaktiivisten aineiden ilmaantuessa huumekäyttöön laboratorioden on pyrittävä vauhdittamaan tunnistusta, eikä tällöin vertailuainetta ole aina tarjolla.

Ongelmaa päätettiin lähteä ratkaisemaan datankäsittelyohjelmien ja tietokantojen avulla. Kyseistä tapaa on hyödynnetty kaasukromatografi- massaspektrometri (GC-MS) -laitteistoa käytettäessä. Tämä on ollut mahdollista toistettavien spektrien ja yhdisteiden hyvän pilkkoutumisen ansiosta.¹⁹

Tässä työssä käytettyä UHPLC-QTOF-laitteistoa ei ole vielä yleisesti yhdistetty laboratorioden väliseen tietokantapohjaiseen tunnistukseen. Tämä johtuu siitä, että nestekromatografialla tunnistettavien yhdisteiden lukumäärä on huomattavasti suurempi kuin kaasukromatografialla. Kaasukromatografiassa yhdisteiden haihtuvuus on rajaava tekijä, joka pienentää tunnistettavien aineiden joukkoa. Lisäksi käytetty QTOF-massaspektrometri puolestaan luo haasteita

jännitteiden säädettävyyden takia. Jännitettä muutettaessa molekyylien törmäysenergia muuttuu vaikuttaen yhdisteiden fragmentoitumiseen. Näin ollen eri laitteista saadut spektrit eivät usein ole olleet suoraan verrattavissa.⁶⁴

3.2. Materiaalit ja menetelmät

3.2.1. Vertailuaineet

Työssä käytetyt aineiden referenssistandardit sisälsivät sekä eri kemikaalivalmistajilta tilattuja standardeja että takavarikkonäytteitä, joiden tunnistus oli tehty NMR-laitteistolla. Taulukossa 6 on lueteltu kunkin vertailuaineen alkuperä. Yhdisteet ovat listattuna liitteessä 1. yhdisteryhmittäin. Näytteiden puhtausluokissa oli alkuperästä johtuvia huomattavia eroja. Käytetyn LC-MS-laadun metanolin toimittaja oli Honeywell. Muurahaishapon ($\geq 98\%$) ja ammoniumasetaatin toimittaja oli Sigma Aldrich/Merck.

Taulukko 6. Vertailuaineiden alkuperät. Lyhenteet ovat selostettu liitteessä 1.

Nimi	Alkuperä	Nimi	Alkuperä
NM-2201	Freiburgin yliopisto	valsartaani	Novartis
MDMB-CHMCZCA	Takavarikkonäyte	4-metyyli- α -PPP	Takavarikkonäyte
5F-3,5-AB-PFUPPYCA	Takavarikkonäyte	3,4-dimetoksifenetyyliamiini	Lipomed
AMB-CHMICA	Takavarikkonäyte	5-IT	Cerilliant
EMB-FUBINACA	Takavarikkonäyte	3-FEA	Takavarikkonäyte
5F-MDMB-PICA	Takavarikkonäyte	3,4-dikloori-N-(2-kloorisykloheksyyli)-N-metyyllibentsamidi	Takavarikkonäyte
JWH-018-M-5-OH-Ind	Cayman / LGC	dekstrorfaani	Toronto Research Chemicals
PB-22	Freiburgin yliopisto	6 α -naloksoli	Sigma Aldrich
5F-MDMB-PICA M7	Cayman / LGC	propofoli glukuronidi Na ⁺ -addukti	Cerilliant
5F-ADB M2	Cayman / LGC	norfludiatsepaami	Takavarikkonäyte
5F-ADB M7	Cayman / LGC	flunitratsolaami	Takavarikkonäyte
4F-butyryfentanyyli	Takavarikkonäyte	4-AcO-DMT	Takavarikkonäyte
syklopentyylifentanyyli	Chiron AS	psilosiini	Cayman / LGC
syklopropyyli-fentanyyli	Chiron AS	4-Aco-Met	Takavarikkonäyte
5-DBFPV	Cayman / LGC	alogliptiini	Toronto Research Chemicals

Nimi	Alkuperä	Nimi	Alkuperä
6-metoksimetyloni	Takavarikkonäyte	saksagliptiini	Toronto Research Chemicals
4-MEAP	Takavarikkonäyte	eprosartaani	Toronto Research Chemicals
2-metyyli-4'-(metyylitio)-2-morfolinopropiofenoni	Takavarikkonäyte	nisoldipiini	Sigma Aldrich
efyloni (N-etyylipentyloni)	Takavarikkonäyte	abakaviiri	Sigma Aldrich
4'-metyyli-α-pyrrolidinoheksiofenoni	Takavarikkonäyte	eplerenoni	Toronto Research Chemicals
4F-α-POP	Takavarikkonäyte	deltametriinin ammoniumaddukti	Sigma Aldrich
MMDA-2	Takavarikkonäyte	THC	Cerilliant
4-kloori-N,N-dimetyyli-α-katinoni	Takavarikkonäyte	mitragyniini	LGC
4-etyylimetkationini (4-EMC)	Takavarikkonäyte	4F-etyylifenidaatti	Takavarikkonäyte
α-PHiP	Takavarikkonäyte	trikloorimetiatsidi	Toronto Research Chemicals
4F-α-PHIP	Takavarikkonäyte	kaptopriili	The Squibb Institute for Medical Research
glimepiridi	Hoechst AG	olmesartaani	Santa Cruz Biotechnology
nilvadipiini	Temmler Werke	apomorfiini	LGC

Kaiken kaikkiaan 56 aineen laimennus suoritettiin analyysia varten. Aineiden referenssistandardeista valmistettiin ensin 0,1 mg/ml käyttöliuokset liuottamalla metanoliin. Yhdisteet jaettiin noin 10 yhdisteen ryhmiin m/z -arvojen perusteella. Ehtona oli, ettei yhdisteryhmässä ole $m/z \pm 1$ mDa sisällä enempää kuin yksi yhdiste. Ryhmien perusteella kuusi seosta, joissa referenssistandardien pitoisuudet olivat 1 μ g/ml. Liuottimena käytettiin metanolia 2-mM ammoniumasetaatissa ja 0,1 % muurahaishapossa suhteessa 45/55.

3.2.2. Nestekromatografi- massaspektrometrilaitteisto ja menetelmä

Näytteet analysoitiin UHPLC-QTOF-laitteistolla. Laitteiston nestekromatografina toimi Dionexin Ultimate 3000 sarjan UHPLC (Sunnyvale, CA, USA) ja korkean erotuskyvyn massaspektrometrina maXis Impact MS (Bruker Daltonics, Bremen, Saksa). Ionilähteenä käytettiin ESI:a.

Nestekromatografian kolonni ja esikolonni olivat molemmat Watersin HSS T₃ (150 mm x 2,1 mm x 1,8 µm ja 2,1 mm x 5,0 mm). Lämpötila kolonnissa oli 60 °C. Näyteajoissa hyödynnettiin gradienttiajoa. Näytettä injektoidiin kolonniin 1 µl ja liikkuvan faasin virtausnopeus oli 0,3 ml/min. Liikkuva faasi koostui liuottimesta A (2 mM ammoniumasetaatti ja 0,1 % muurahaishappo) ja liuottimesta B (metanoli). Gradientt ajo alkoi yhdistelmällä, jossa luotinta B oli 20 % (0–2 min) ja jatkui lineaarisella gradientilla nostamalla liuottimen B osuutta 20–95 % (2–14 min). Gradientti pidettiin vakiona liuottimen B osuuden ollessa 95 % (14–17 min) ja laskettiin takaisin 20 % (17–18 min). Ajon jälkeen gradientin annettiin tasaantua 4 min, joten ajoaika yhteensä oli 22 min.

Massaspektrometrin erotuskyky oli laitteen teknisten tietojen mukaan $\geq 40\,000$ FWHM. Spektrometrilla tutkittiin positiivisia ioneja m/z -arvon rajauksella 50–700 Da. Ionilähteen sumutuskasun paine oli 2 bar ja kuivauskaasuna käytettiin typpeä virtausnopeudella 8 L/min lämpötilassa 200 °C. Ionilähteen jännite oli 4,5 kV. Törmäyskammion fragmentointijännite oli 30 eV. Mittaus suoritettiin bbCID-tekniikalla, jolloin tuloksena saatiin sekä MS- että MS/MS-spektrit. Massan kalibrointiin käytettiin natriumformiaatin yhdeksää klusteri-onia, joiden eksaktit massat olivat välillä 90,9766–634,8760 Da. Instrumentti kalibroitiin natriumformiaatilla suorasyötöllä ennen jokaista ajosarjaa, jonka lisäksi jokaiselle näytteelle tehtiin ajon jälkeinen yksilöllinen kalibrointi injektoidulla kalibranttiliuosta ajon alussa injektion jälkeen.

3.2.3. Työssä käytetyt ohjelmistot

Työssä hyödynnettiin neljää eri ohjelmistoa. Fragmenttien tunnistukseen käytettiin ACD/Labsin MS Fragmenteria (ACD Labs Toronto, Kanada) sekä Brukerin Compass DataAnalysis (Bruker Daltonics) ohjelman SmartFormula 3D lisätyökalua. ACD/MS Fragmenter ennustaa prekursori-ionin fragmentoitumista hyödyntämällä kirjallisuudesta tunnettuja fragmentoitumissääntöjä. SmartFormula 3D puolestaan laskee käyttäjän valitsemille spektriipiikeille mahdollisia molekyylikaavoja eksaktien ja tarkkojen massojen avulla.

Yhdisteiden vienti sisäiseen tietokantaan tehtiin datan prosessointiohjelmistolla TASQ:lla (Target Analysis for Screening and Quantitation, Bruker, Saksa). Työssä käytettiin myös verkossa sijaitsevaa m/zCloud-tietokantaa yhdisteiden mitattujen ja kirjastospektrien vertailuun.

3.2.4. m/zCloud-tietokanta

m/zCloud on verkossa sijaitseva massaspektrien tietokanta, jonka kautta käyttäjä pystyy vertailemaan itse mittaamiensa spektrien yhdenmukaisuutta muiden luotettavaksi todettujen käyttäjien tuottamiin spektreihin (www.mzcloud.org). Tietokanta hyödyntää käyttäjien itse tuottamaa sisältöä, ja siten luo mahdollisuudet laajalle ja kattavalle yhdisteiden tietokannalle. Käytettävän spektrikirjaston onkin oltava mahdollisimman kattava, mikäli sitä halutaan hyödyntää nestekromatografian kanssa.

Tietokanta sisältää yhdisteiden MS-spektrien lisäksi MS²-spektrit eri jännitteillä mitattuina. m/zCloud käyttää jännitteen yksikkönä normalisoitua törmäysenergiaa (engl. normalized collision energy, NCE), jota ei voida suoraan vertailla esimerkiksi elektronivoltteihin. Tietokanta sisältää spektrit väliltä 10-200 NCE. Eri jännitespektrejä sisältävä tietokanta sopii erinomaisen hyvin HRMS-spektrivertailuun, sillä jännitteiden vaihdeltavuus tuottaa tuloksena saataviin spektreihin eroja laitteistojen välille. Siispä näiden kahden ominaisuutensa takia m/zCloud luo mahdollisuuden hyödyntää UHPLC-QTOF-laitteiston dataa vertailuaineettomien uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistuksessa.

Haettaessa spektrejä m/zCloud-tietokanta antaa käyttäjän valita kolmesta eri hakualgoritmista. Algoritmit vertailevat käyttäjän syöttämää spektriä kirjastospektreihin eri painoarvoilla, ja näin ollen jokainen algoritmi antaa spektrejä vertaillessa eriarvoisen tunnistusprosentin. Tunnistusprosentti kuvaa syötetyn ja kirjastosta löydetyn spektrin yhdenmukaisuutta. Mitä korkeampi tunnistusprosentti on, sitä varmemmin on kyse samasta yhdisteestä. Tässä työssä käytettiin pääosin hyödyksi m/zCloudin HighRes-algoritmia, mutta vertailtiin lyhyesti myös kahden muun (Opt. Dot Product, NIST) algoritmin toimintaa.

HighRes-algoritmi laskee lopullisen yhdenmukaisuusprosentin kahden eri muuttujan avulla. Vaikuttavat muuttujat ovat m/z -arvo ja runsaus. Molemmat muuttujat vaikuttavat yhdenmukaisuusprosenttiin korrelaatiokertoimien avulla. Muuttuja m/z -arvo kuvaa m/z -arvojen eroavaisuuksia kahden spektrin välillä. Se lasketaan painotettuna keskiarvona päällekkäisten piikkien yksiköttömänä etäisyytenä. Runsauden korrelaatiokerroin määrittelee puolestaan esiintyvyyksien suhteellista korrelaatiota. Tämän lisäksi korrelaatiokerroin ottaa huomioon kahden spektrin päällekkäisten piikkien esiintyvyyksien suhteen ja jakaa sen esiintyvyyksien summalla. Algoritmi soveltuu HRMS-spektrien tulkitsemiseen etenkin m/z -arvojen tarkkuuden korostamisen ansiosta.⁶⁵

Algoritmeista toinen, Opt Dot Product käyttää yhdenmukaisuuden laskennassa apuna pistetuloa. Opt Dot Product ja HighRes -algoritmien suurin ero onkin pistetulon käyttö, sillä HighRes ei puolestaan käytä pistetuloa olleenkaan avuksi laskiessaan spektreille yhdenmukaisuusprosentteja.⁶⁵

3.3. Mittausten kulku ja tulokset

Seuraavaksi on kuvattu mittausten kulku ja alustavien kriteerien luonti tuntemattoman yhdisteen tunnistukselle. Aluksi yhdisteille selvitettiin retentioajat (Liite 2) ja tunnistettiin fragmentit. Jokaiselle yhdisteelle määrättiin löydöksen mukaan yhdestä viiteen ominaista fragmenttia. Tunnistus onnistui 55 yhdisteelle kaikista 56 yhdisteestä. Oikeiden fragmenttien yhdistäminen prekursori-ioniin lisää tunnistamisen varmuutta ja täten vähentää väärin tunnistusten mahdollisuutta rutiinianalytiikassa. Fragmenttien yhdistäminen prekursoriin tapahtui tutkimalla yhdisteiden koeluoituvuus ja mahdollinen fragmentoitumisreitti. Fragmenteille selvitettiin omat m/z -arvot, bruttokaavat ja ionisuhteet.

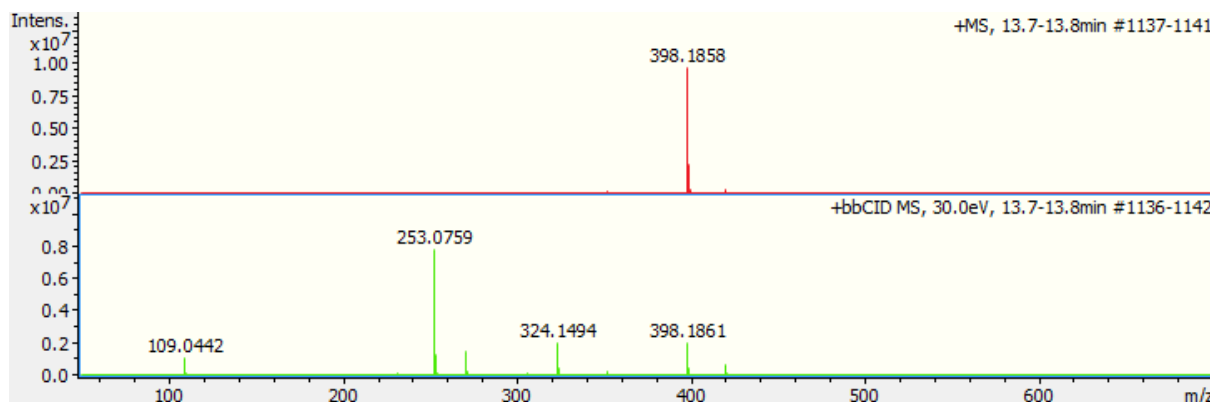
Positiivisesti tunnistettuja yhdisteitä ja niiden spektrejä käytettiin m/z Cloud-tietokannan toiminnan testauksessa. Testauksessa tutkittiin tietokannan ja datankäsittelyn hyödyntämistä yhdisteiden tunnistamisessa ilman vertailuaineita. Jako yhdisteryhmiin (Liite 1) mahdollisti samankaltaisten yhdisteiden tarkastelun m/z Cloud-tietokannan tunnistuksissa sekä fragmentoitumisessa.

Fragmenttien tunnistus epäonnistui yhdelle yhdisteelle. Yhdisteistä trikloorimetriatsidi hajosi jo ionilähteessä estäen detektoinnin. Yhdisteistä propofoliglukunoridi ja deltametriini muodostivat addukteja. Nämä adduktit tunnistettiin ja niille määritettiin fragmentit.

3.3.1. Fragmentoituminen

Fragmentin tunnistukseen vaadittiin oletusarvona seuraavat kolme asiaa; ensimmäiseksi SmartFormula 3D -ohjelman täytyi löytää fragmenttiehdokasta vastaava bruttokaava, toiseksi MS Fragmenterin täytyi tunnistaa ehdotettu fragmentti ja kolmanneksi fragmentin täytyi eluoitua samanaikaisesti prekursori-ionin kanssa. Muutamassa tapauksessa ohjelmistoista vain toinen tunnistoi koeluoituvan fragmentin. Tällöin suoritettiin silmämääräinen vertailu fragmenttiehdokkaan ja prekursorin rakenteiden välillä. Jos fragmenttiehdokas todettiin prekursorin loogiseksi fragmentiksi, voitiin se hyväksyä ohjelmistojen ristiriidasta huolimatta.

SmartFormula 3D on laskennallinen työkalu spektrien karakterisointiin. Valitusta MS- ja bbCID-spektriparista (kuva 8) työkalu laskee, mitkä bbCID-spektrin piikit ovat laskennallisesti mahdollisia MS-spektrin prekursorin tuoteioneja annetussa m/z -ikkunassa. Se laskee tuoteionikandidaattien molekyylikaavat sekä parillisille että parittomille elektronikonfiguraatioille.



Kuva 8. Synteettisen kannabinoidin EMB-FUBINACA:n MS- ja bbCID MS-spektrit. Ylemmässä spektrissä nähdään prekursori-ionin aiheuttama piikki. Alemmassa näkyy molekyylien törmäyksistä aiheutuneen fragmentoinnin tulos.

Yhdisteiden fragmentit taulukoitiin (Liitteet 3–13). Fragmentit valittiin SmartFormula3D ja MS Fragmenterin ehdokkaita vertailemalla. Näille 55 yhdisteelle tunnistettiin yhteensä 156 ominaista fragmenttia. Kaikille yhdisteille tunnistettiin vähintään yksi ja korkeintaan viisi fragmenttia. Jokaiselle fragmentille määritettiin bruttokaava, m/z -arvo ja fragmenttien pariteetti. Taulukoista nähdään esimerkiksi elektronikonfiguraatioiltaan parillisten fragmenttien suuri määrä verrattuna parittomiin fragmentteihin.

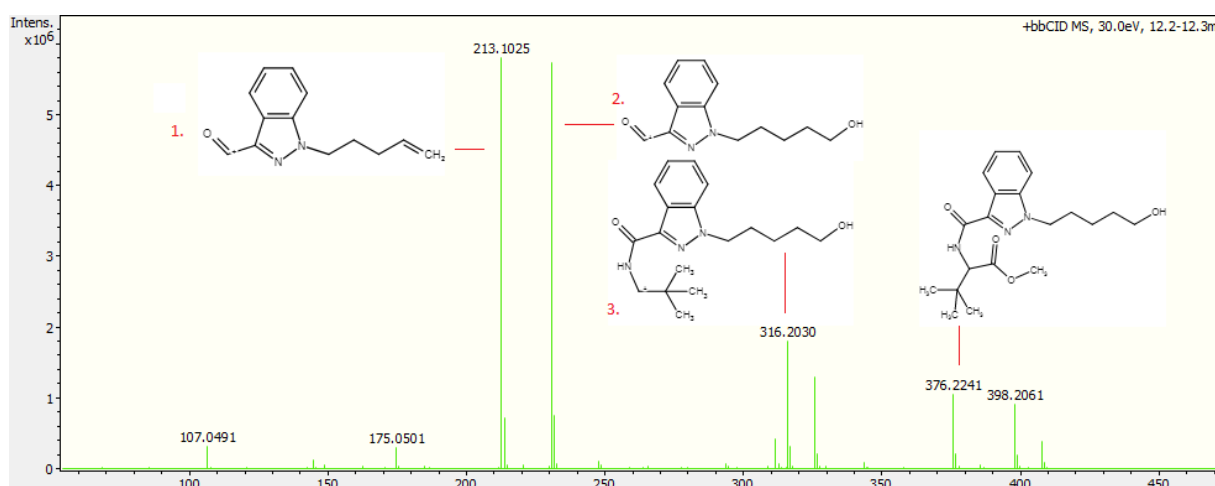
Fragmenttien tunnistuksessa SmartFormula 3D:n avulla massatarkkuuden rajaksi asetettiin 2 mDa ja isotooppijakauman suhteellisten eroavaisuuksien rajaksi 50 mSigma. Ohjelman algoritmi laski kriteerit täyttävät bruttokaavat, jotka olivat laskennallisesti mahdollisia. Listasta valittiin tunnettu prekursori ja ohjelman ehdottamat fragmentit kyseiselle rakenteelle.

Saadut potentiaaliset fragmentit varmistettiin ACD/MS Fragmenterin avulla. Tunnettujen fragmentoitumissääntöjen avulla ACD/MS Fragmenter muodosti prekursori-ionille fragmentoitumispuita, joihin saatuja fragmentteja verrattiin. Protonointitekniikaksi valittiin

ilmanpaineessa tapahtuvat ionisaatiotekniikat, joihin tässä työssä käytetty ESI lukeutuu. Fragmentoitumisten välivaiheille asetettiin maksimiarvoksi aluksi kolme, mutta arvoa nostettiin käsittelyn aikana viiteen monimutkaisten molekyyliarakenteiden vuoksi.

Fragmentit tarkistettiin vielä lopuksi koeluoituviksi Brukerin DataAnalysis -ohjelmalla, ja positiivinen tunnistus SmartFormula 3D:llä ja ACD/MS Fragmenterilla vahvisti kandidaatit tuoteioneiksi. Mikäli toinen ohjelmista ei tunnistanut fragmenttia voitiin fragmentin molekyylikaavan avulla tarkastella oliko fragmentti prekursorin mahdollinen osa. Jos näin oli, voitiin fragmentti hyväksyä ristiriidasta huolimatta.

Fragmenttien bruttokaavojen tunnistus mahdollisti fragmenttien rakenteen hahmottelun. Rakenteiden ollessa tiedossa saatiin tutkittua yhdisteryhmittäin lohkeamiselle alttiita kohtia molekyyliarakenteissa. Kuva 9 havainnollistaa fragmenttien rakennekaavojen hahmottelua yhdisteen spektrin ja MS Fragmenter ohjelmiston avulla.



Kuva 9. Esimerkkinä 5F-ADB:n metaboliitti 2:lle MS Fragmenterin ja SmartFormula 3D:n ehdottamat fragmentit UHPLC-QTOF-laitteistossa. Kuvassa nähdään mitattu bbCID-spektri ja ohjelmien ehdottamat fragmentit 1-3. Spektrissä näkyvissä myös prekursorin piikki 376.2241 kohdalla. 5F-ADB:n metaboliitti 2 on ehdotettujen fragmenttiensa perusteella luultavasti altis lohkeamaan amidisidoksen kohdalta.

Lohkeava rakenne oli suurimmassa osassa tapauksista helppo nähdä molekyylistä, sillä heteroatomeja sisältävät orgaaniset rakenteet ovat tiedetysti epästabiilimpia kuin hiili-hiili sidokset. Yleisesti ottaen lohkeamiselle alttiita ryhmiä 55 yhdisteen otannan perusteella olivat amino-, amidi-, amido-, karbonyyli-, alkoksi-, esteri- ja hydroksyyli-ryhmät.

Yhdisteryhmäkohtaisella vertailulla voitiin tutkia samankaltaisten yhdisteiden fragmentoitumistaipumusta. Havaittiin, että samankaltaisilla yhdisteillä lohkeamiselle altis kohta on usein sama. Tämä voi olla avuksi tuntemattomien yhdisteiden tunnistamisessa. Taulukossa 7 on lueteltu yhdisteryhmien yleisimmiksi havaitut lohkeamakohdat.

Taulukko 7. Yhdisteryhmät ja niiden fragmentoitumiselle alttiit rakenteet.

Yhdisteryhmä	Fragmentoitumiselle alttiit rakenteet
Synteettiset kannabinoidit	amido- ja esteriryhmät
Fentanyyli johdannaiset	amidiryhmät
Katinonijohdannaiset	karbonyyli-, esteri-, alkoksi- ja aminoryhmät
Fenetyyliamiini johdannaiset	amino- ja alkoksiryhmät, hiili-hiili sidos
Synteettiset opioidit	amino-, amidi-, karbonyyli- ja hydroksyyliiryhmät
Bentsodiatsepiinit	amidiryhmät
Tryptamiinit	amino- ja esteriryhmät
Gliptiinit	amino- ja hydroksyyliiryhmät
Sartaanit	aminoryhmät
Dihydropyridiinit	esteriryhmät

Lohkeamiselle alttiiden ryhmien tunnistaminen on hyödyksi tuntemattomien yhdisteiden tutkimisessa siinä vaiheessa, kun yhdisteelle on olemassa ehdotettu rakennekaava. Kaavaa voidaan tutkia kyseisten ryhmien varalta, ja verrata mahdollisia fragmentteja fragmenttispektriin. Molekyylikaavan fragmenttien m/z -arvojen ja fragmenttispektrissä näkyvien runsaimpien fragmenttien m/z -arvojen ollessa samoja vahvistavat ne alustavaa tunnistusta.

Tunnistetuista 156 oikeasta fragmentista SmartFormula 3D laski oikein yhteensä 151. Tämä tarkoittaa 97 % onnistumista. Lisäksi ohjelma laski 10 väärää fragmenttia, jotka eivät eluoituneet prekursorin kanssa samaan aikaan. MS Fragmenterin tunnistusprosentti 156 mahdollisesta fragmentista oli 78 %. MS Fragmenter tunnisti siis mahdolliset fragmentoitumismekanismit 122 yhdisteelle. Tunnistusprosentti MS Fragmenterilla on

huonompi siitä syystä, että ohjelma tunnistaa fragmentit käyttäen molekyylin rakennetta ja fragmentoitumissääntöjä. Tämä on huomattavasti monimutkaisempi tapa kuin SmartFormula 3D:n mittausdatasta laskeminen.

3.3.2. Yhdisteiden vienti tietokantaan

Yhdisteet vietiin laboratorion sisäiseen UHPLC-QTOF tietokantaan. Vienti tehtiin käyttäen mittausdatan prosessointiohjelmistoa TASQ (Target Analysis for Screening and Quantitation, Bruker, Saksa). Vientiä varten yhdisteiden fragmentit asetettiin tärkeysjärjestykseen. Tämä tehtiin vertailemalla fragmenttien piikkien runsauksia. Jokaiselle yhdisteelle valittiin runsainta fragmenttia tuoteioneiksi. Valituista ioneista runsaimmalle ionille eli ensimmäiselle tuoteionille selvitettiin ohjelmiston avulla ionisuhde.

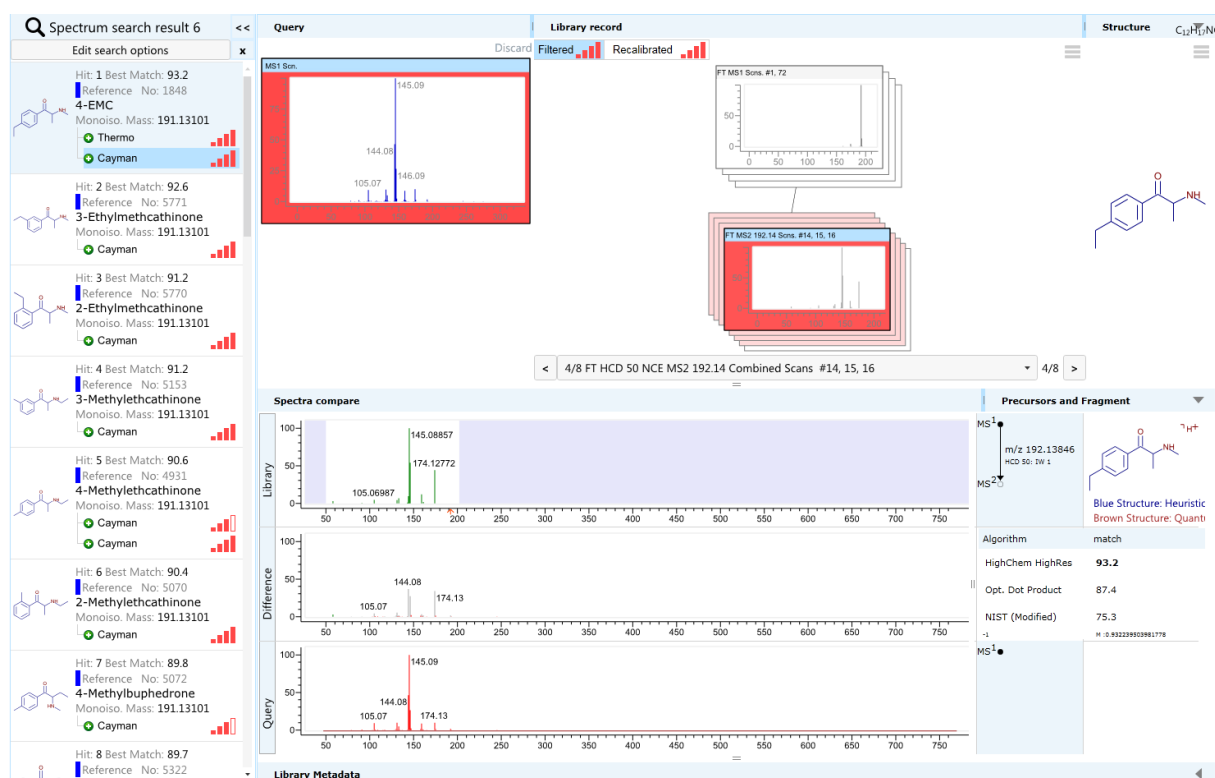
Nämä tuoteionit toimivat jatkossa retentioajan ja isotooppijakauman lisäksi tunnistuksen apuna rutiinianalytiikassa. Yhdisteiden vienti tietokantaan mahdollisti 55 uuden yhdisteen tunnistamisen virtsan huumausaineseulonnoissa.

3.3.3. Yhdisteiden tunnistaminen ilman referenssistandardia

Spektreistä tehtyjen positiivisten tunnistusten perusteella voitiin tutkia mahdollisuutta tunnistaa tuntematon yhdiste tietokannan avulla. Tässä osassa tarkasteltiin HighChemin m/zCloudin toimivuutta kyseiseen tarkoitukseen.

Tutkimuksessa syötettiin 55 yhdisteen spektrit tietokantaan. Esitietoina pidettiin yhdisteen fragmentoitumisspektriä sekä prekursorin tarkkaa massaa 1 mDa ikkunassa. Tämän lisäksi pidettiin intensiteetin suhteellisenä raja-arvona 0,07 % maksimi-intensiteetistä. Algoritmi ei ottanut piikkejä mukaan vertailuun, mikäli niiden suhteellinen intensiteetti oli alle kyseisen arvon. Ohjelmiston hakukriteereiksi asetettiin yhdisteen tunnistus MS²-spektristä, ionilähteeksi ESI ja normalisoiduksi törmäysenergiaksi 10–100 NCE.

Spektrejä haettaessa saatiin kuvan 10 näköinen tulosruutu. Käyttäjän suorittaessa spektrihakua ohjelmisto kävi läpi yksitellen jokaisen yhdisteen eri jännitespektrit ja ilmoitti parhaan osuman. Ohjelmisto loi eri jännitteisiä spektripuita, jotka mahdollistivat yhdisteen fragmentoitumisen laajemman tutkimisen. Ohjelma käyttää fragmentointijännitteen yksikön eV sijasta normalisoituja törmäysenergiaita (NCE), joita ei voi suoraan verrata tutkimuksessa käytettyihin eV arvoihin. Arvot antavat kuitenkin suuntaa siitä, millainen NCE-arvo on käytettäessä tiettyä fragmentointijännitettä.



Kuva 10. m/zCloud-tietokannan tulosruutu. Vasemmalla näkyy ohjelman ehdottamat tunnistukset paremmuusjärjestyksessä. Alhaalla esitetään syötetyn ja kirjastospekttrin vertailu. Ylhäällä puolestaan näytetään kirjastospektreistä luotu spektripuu. Ylempänä spektripuussa esitetään MS¹-spektrit. MS¹-spektri jakautuu MS²-spektrien joukoksi, jotka kaikki ovat mitattu eri jännitteillä. Eri jännitteillä mitattuja spektrejä voi selata ja vertailla käyttäjän omaan mittadataan. Oikealla kuvassa näkyvät vielä eri algoritmien tunnistusprosentit.

Yhdisteiden vertailussa keskityttiin aluksi vertailemaan kolmea algoritmia. Seuraavaksi tutkittiin tunnistaako ohjelma tunnetun yhdisteen oikein, kuinka hyvä tunnistusprosentti on ja

mikä kirjastospektrin törmäysenergioista (NCE) antaa parhaan tunnistusprosentin. Lopuksi luotiin kriteerit tuntemattoman yhdisteen tunnistamiselle ilman vertailuainetta. Algoritmien vertailussa massatarkkuuden rajana tunnistuksessa pidettiin $m/z \pm 10$ mDa. Kun paras algoritmi oli tunnistettu, siirryttiin $m/z \pm 1$ mDa rajoihin yhdisteiden tunnistuksen tutkimista varten.

Aloitettiin vertailemalla m/zCloudin algoritmeja (Liite 14). Ohjelma pitää sisällään kolme vaihtoehtoista algoritmia, joiden toimintaa tarkasteltiin yhdistejoukon tunnistamisessa. Ensimmäisellä, HighRes algoritmilla oikeiden tunnistusten keskiarvo oli 82 %:n yhdenmukaisuus. Toiseksi paras tai väärän yhdisteen tunnistus tehtiin keskimäärin 70 %:n yhdenmukaisuudella. Toisella pistetuloa hyödyntävällä Opt Dot Product-algoritmilla oikea tunnistus tehtiin keskimäärin 83 %:n yhdenmukaisuudella. Mielenkiintoista oli, että Opt Dot Product erotti monissa tapauksissa oikean tuloksen suuremmalla erolla vääristä yhdisteistä. Keskimäärin toiseksi paras tai väärä tunnistus sai tällä algoritmilla 49 %:n yhdenmukaisuuden. Tästä huolimatta Opt Dot Product tunnisti HighRes-algoritmia enemmän vääriä yhdisteitä. Opt Dot Product-algoritmilla oli 11 tapausta, joilla ensimmäinen algoritmin ehdotus ei ollut tutkittu yhdiste. HighRes-algoritmilla tapauksia oli vain kuusi. Monet vääristä tunnistuksista olivat kuitenkin paikkaisomeereja pienillä tunnistusprosenttien eroilla. Niitä ei siis olisi voinut lukea varmoiksi tunnistuksiksi myöskään HighRes-algoritmin tuloksilla.

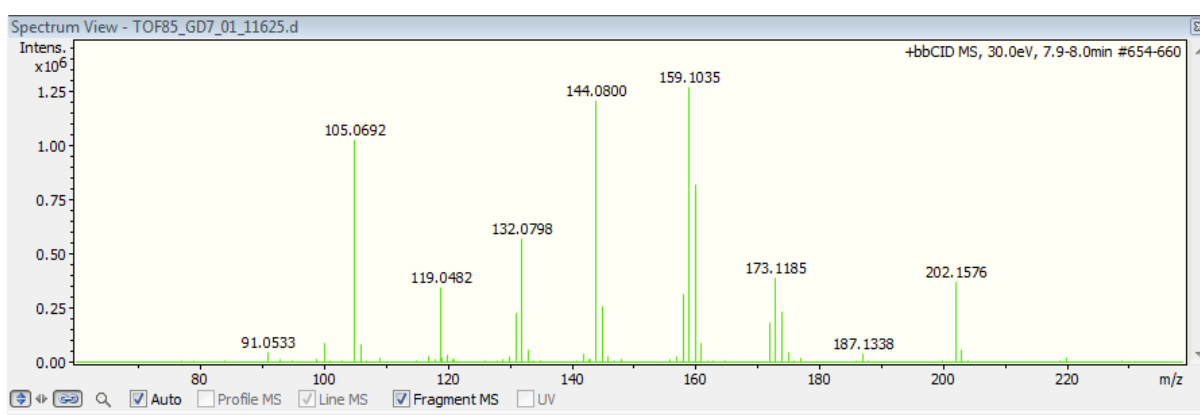
Myös kolmatta NIST-algoritmia testattiin yhdisteiden tunnistuksessa. Tämä algoritmi tunnisti kuitenkin yhdisteet huomattavasti huonommin, keskimäärin 70 %:n yhdenmukaisuudella. Toiseksi parhaiden tai väärin tunnistusten keskiarvo oli 50 %:n yhdenmukaisuus, ja vääriä tunnistuksia oli myös 12. Väärät tunnistukset olivat taas lähekkäin oikeiden tunnistusten yhdenmukaisuusprosenttien kanssa. Tulosten perusteella lähdettiin tutkimaan yhdisteiden tunnistusta HighRes-algoritmilla pienentämällä sallittua m/z -arvon virhettä.

Yhteensä 55 yhdisteestä m/zCloud tunnisti 36 yhdistettä oikein. Tietokannasta ei löytynyt 14 yhdistettä ja viisi yhdistettä tunnistettiin toisena tai kolmantena osumana. Näistä viidestä hausta kolme oli paikkaisomeerejä, yksi oli läheinen rakenneisomeeri ja yksi voimakkaasti pilkkoutuneen yhdisteen epäedustava spektri.

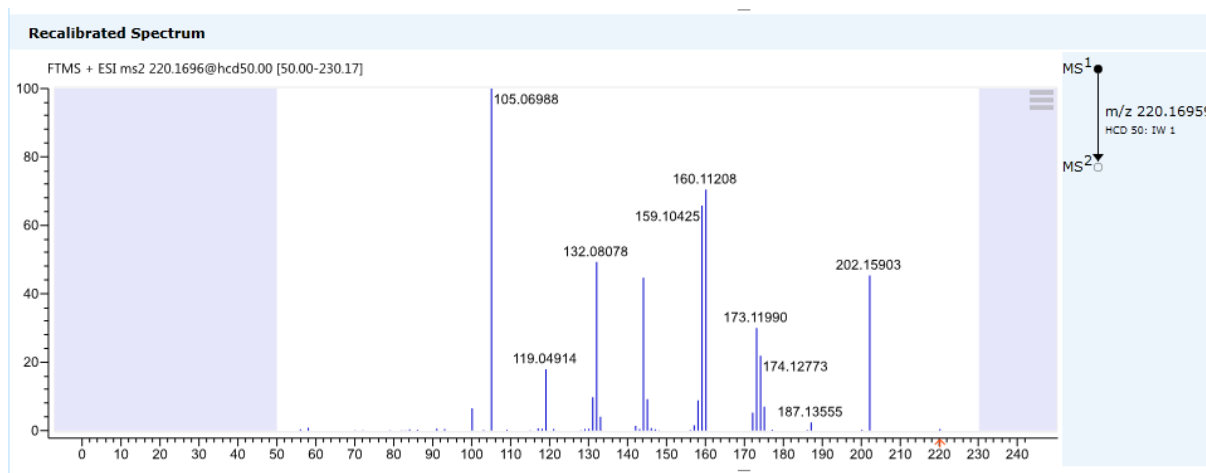
Yhdisteiden tunnistukset koottiin taulukoihin (Liitteet 15–23). Yleisesti ottaen synteettisten kannabinoidien, katinonijohdannaisten, fenetyyliamiinijohdannaisten, synteettisten opioidien ja sartaanien tunnistus sujui m/zCloud-tietokannalta hyvin. Oikeat tunnistukset olivat m/zCloudin kirjastospektreissä 10–50 NCE-arvoilla. Yhdisteryhmistä fentanyylijohtannaissilla, bentsodiatsepiineilla, tryptamiineilla, gliptiineilla ja sartaaneilla vähintään puolet ryhmän

yhdisteistä joko puuttui tietokannasta tai ohjelmisto ehdotti väärää yhdistettä. Kaikki näistä ryhmistä sisälsivät kuitenkin vain kaksi tai kolme yhdistettä, joten tulosta ei voida pitää kovin luotettavana.

Oikeille tunnistuksille m/zCloud tunnistusprosentit olivat yleisesti ottaen ≥ 80 %. Ajetun spektrin ollessa hyvälaatuinen päästiin jopa yli 90 % tunnistukseen HighRes-algoritilla. Kuvissa 11 ja 12 nähdään esimerkkinä yhdisteen 4-MEAP itse mitattu hyvälaatuinen spektri ja tietokannan spektri. Kuvista nähdään hyvä massatarkkuus spektrien välillä ja siistit fragmentit, jotka mahdollistavat yhdisteen tunnistuksen. Yhdisteelle 4-MEAP saatiin tietokantahaussa oikea tunnistus ja 91,6 % yhdenmukaisuus.



Kuva 11. Yhdisteen 4-MEAP mitattu spektri.



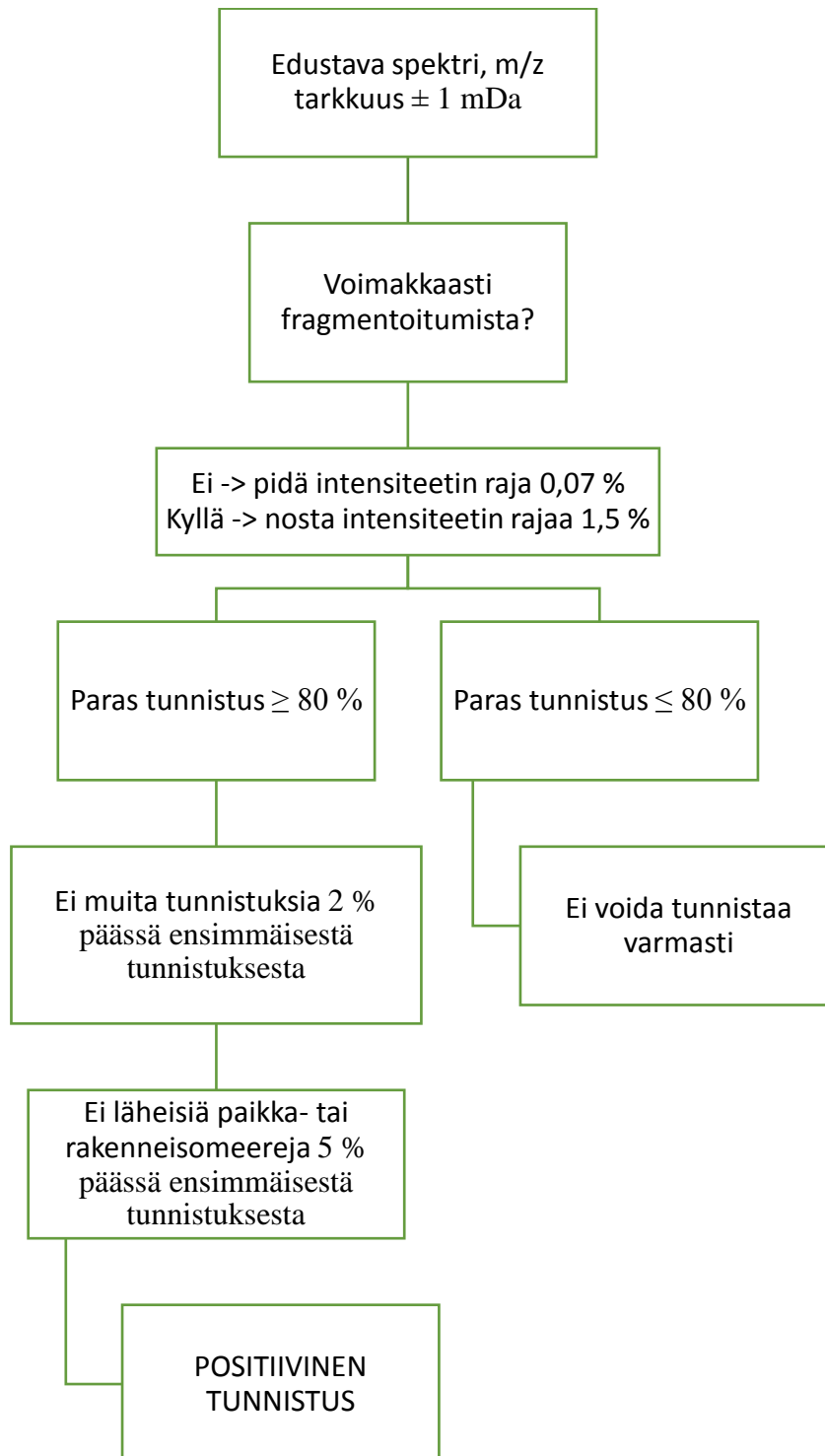
Kuva 12. Yhdisteen 4-MEAP 50 NCE-spektri m/zCloud-tietokannassa.

Tulokset kaikilla yhdisteillä eivät tuottaneet samankaltaista luotettavaa tunnistusta. Tämä ongelma tuli esiin etenkin voimakkaasti pilkkoutuneiden tryptamiinien kohdalla. Spektrien m/z-arvoja painottava HighRes-algoritmi ei toiminut toivotulla tavalla silloin kun spektri koostui

lukemattomista matalaintensiteettisistä piikeistä. Kyseisissä tapauksissa päätettiin nostaa suhteellisen intensiteetin rajaa 1,5 %:iin. Intensiteetin rajaa nostettiin seuraaville yhdisteille: 4-Aco-DMT, psilosiini, 4-Aco-Met, valsartaani, eplerenoni ja THC. Näistä yhdisteistä kolme ensimmäistä kuuluu tryptamiineihin. Intensiteetin nostaminen toimi, ja sen ansiosta tunnistusprosentit näille voimakkaasti pilkkoutuville yhdisteille nousivat huomattavasti.

3.3.4. Kriteerit yhdisteiden tunnistamiselle

Tuloksien perusteella voitiin seuraavaksi luoda kriteerit yhdisteen alustavalle tunnistamiselle m/zCloud-tietokannalla ilman vertailuainetta. Edellytyksenä tunnistukselle on hyvälaatuinen fragmenttispektri. Mikäli yhdiste on voimakkaasti pilkkoutunut, täytyy tämä huomioida vertailussa tai tehdä mittauksia pienemmällä pilkkoutumisjännitteellä. Oikeat tunnistukset hyvälaatuisista spektreistä saivat keskimäärin 84 %:n vastaavuuden. Vastaavuuksien keskihajonta oli 4 %. Todennäköisen tunnistuksen vastaavuuden rajaksi päätettiin valita 80 %, sillä tällä prosenttiosuudella suurin osa (> 80 %) oikeista tunnistuksista tehdään, mutta vääriä tuloksia ei vielä havaittu. Tämän vastaavuusprosentin alapuolelta löytyy silti vielä oikeita tunnistuksia, mutta tällöin myös muiden kuin oikean tunnistuksen todennäköisyys kasvaa. Mikäli ohjelma tunnistaa monia läheisiä rakenteita lähes yhtä suurilla tunnistusprosentteilla, ei tunnistusta voida tehdä. Tunnistusta ei voida myöskään tehdä paikkaisomeerien väliltä. Kriteerit tunnistukseen nähdään kuvasta 13. Kriteerit luotiin HighRes-algoritmille. Käytetyllä 30 eV jännitteellä saatujen tulosten perusteella voitiin lisäksi arvioida yhtäläisyyksien olevan luotettavia NCE-arvon ollessa 10-50. Mikäli algoritmi ehdottaa tunnistusta NCE-arvoilla 60-100 voidaan todeta yhdiste voimakkaasti pilkkoutuneeksi ja nostaa intensiteetin raja-arvoa.



Kuva 13. Kriteerit yhdisteen alustavalle tunnistamiselle ilman vertailuainetta.

4. YHTEENVETO

Uusista psykoaktiivista aineista tällä hetkellä eniten esillä olevat yhdisteryhmät ovat synteettiset kannabinoidit, kationit ja fentanyyli johdannaiset. Näistä kolmesta kannabinoidit ja kationit muodostavat suurimman osan huumausainekäytössä esiintyvistä yhdisteistä, mutta fentanyylit aiheuttavat käyttöön suhteutettuna herkimmin yliannostuksia.

Uusien psykoaktiivisten aineiden nopea ilmaantuminen huumekäyttöön ja aineiden erilaiset ominaisuudet ovat johtaneet laajakirjoiseen analyysivalikoimaan. Laitteistokanta on siirtynyt immunokemiallisista menetelmistä massaspektrometreihin niiden yleistyttyä ja hinnan laskettua. Valittava analyysimenetelmä päätetään myös sen mukaan, tunnetaanko analysoitavat yhdisteet vai ei. Mikäli yhdiste tunnetaan, voidaan analyysimenetelmä valita vapaammin LRMS- ja HRMS-laitteistojen väliltä. Mikäli yhdistettä ei tunneta, analyysimenetelmät rajautuvat HRMS-laitteistoihin ja datasta riippumattomiin mittauksiin. Datasta riippumattomat mittaukset tuottavat suuren määrän dataa näytteestä, jolloin tuntemattomien yhdisteiden löytäminen tuotetusta spektristä on mahdollista. Yhdisteen ollessa haihtuva myös GC-MS-tekniikan käyttö on mahdollista.

Myös datankäsittely riippuu mittauksen lähtöasetelmista. Datankäsittely suoritetaan sen mukaan, tunnetaanko analyyttiä ja onko yhdisteestä olemassa vertailuainespektriä. Mikäli vertailuainetta ei ole, ei voida tunnistusta sanoa varmaksi. Varma positiivinen tulos vaatii siis edelleen aina vertailuaineen, mikä hidastaa huomattavasti uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistusta. Tästä on noussut tarve kehittää toimintatapoja aineiden tunnistamiseksi ilman vertailuainetta. Tässä työssä tunnistettiin 55 yhdisteelle vähintään yksi ja enintään viisi ominaista fragmenttia. Yhteensä fragmentteja tunnistettiin onnistuneesti 156.

Fragmenttien tunnistusta varten mitattuja yhdistespektrejä hyödynnettiin onnistuneesti m/zCloud-tietokannan tutkimuksessa. Ohjelmisto ehdotti ensimmäisenä vaihtoehtona oikeaa yhdistettä 88 % tapauksista, joissa yhdiste löytyi tietokannasta. Lopuissa 12 % tapauksista oli suurilta osin kyse siitä, ettei ohjelma pystynyt tunnistamaan paikkaisomeereja. Tällä oletuksella oikeiden tunnistusten määrä nousee 95 %:iin. Näillä perusteilla ohjelmaa voidaan pitää sopivana tuntemattomien yhdisteiden alustavaan tunnistamiseen ilman vertailuainetta.

Tämän tutkielman tarkoitus oli tutkia uusien psykoaktiivisten aineiden tunnistusmahdollisuuksia ilman referenssistandardeja. Tutkimuksen perusteella voidaan sanoa

Smart Formula 3D:n, MS Fragmenterin ja m/zCloudin toimivan tässä tarkoituksessa hyvin. Kun käytössä on hyvälaatuinen spektri ja yhdisteen tarkka massa, voidaan tehdä luotettava tunnistus käyttämällä hyväksi näitä kolmea ohjelmistoa. Spektrien laskennallinen tarkastelu ei kuitenkaan mahdollista paikkaisomeerien tai erityisen läheisten rakenneisomeerien tunnistusta.

Tutkimusta voitaisiin jatkaa joko tutkimalla jännitemuutosten vaikutuksia spektrien tunnistukseen, tai testaamalla tunnistuksen toimivuutta aidolla tuntemattomalla yhdisteellä. Useammat mittaukset yhdisteistä eri jännitteillä mahdollistaisivat useamman spektrin vertailun, ja täten lisääisivät tunnistusten luotettavuutta. Voimakkaasti pilkkoutuneille yhdisteille jännitteen vähentäminen tarkoittaisi parempaa spektriä, jolloin myös näille olisi mahdollista saada varmemmin oikea tunnistus. Tuntemattoman yhdisteen tutkiminen suoritettaisiin luotujen kriteerien mukaan, jolloin testattaisiin niiden toimivuutta todellisuudessa.

5. VIITELUETTELO

1. D. Favretto, J. P. Pascali and F. Tagliaro, *New challenges and innovation in forensic toxicology: Focus on the New Psychoactive Substances*, 2013.
2. Euroopan huumaussaineiden ja niiden väärinkäytön seurantakeskus (2018), Euroopan huumeraportti 2018: Suuntauksia ja muutoksia, Euroopan unionin julkaisutoimisto, Luxemburg.
3. Euroopan huumaussaineiden ja niiden väärinkäytön seurantakeskus (2014), Euroopan huumeraportti 2014: Suuntauksia ja muutoksia, Euroopan unionin julkaisutoimisto, Luxemburg.
4. M. H. Baumann, E. Solis, L. R. Watterson, J. A. Marusich, W. E. Fantegrossi and J. L. Wiley, *J. Neurosci.*, 2014, **34**, 15150 (DOI:10.1523/JNEUROSCI.3223-14.2014).
5. Matthias Liechti, *Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling*, EMH, Switzerland, 2015.
6. P. Quintana, M. Ventura, M. Grifell, A. Palma, L. Galindo, I. Fornís, C. Gil, X. Carbón, F. Caudevilla, M. Farré and M. Torrens, *International Journal of Drug Policy; New Psychoactive Substances and Human Enhancement Drugs*, 2017, **40**, 78-83 (DOI://doi.org/10.1016/j.drugpo.2016.10.006).
7. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2018), Fentanils and synthetic cannabinoids: driving greater complexity into the drug situation. An update from the EU Early Warning System (June 2018), Publications Office of the European Union, Luxembourg.
8. L. J. De Felice, R. A. Glennon and S. S. Negus, *Synthetic cathinones: Chemical phylogeny, physiology, and neuropharmacology*, 2014.
9. M. Collins, *Drug Testing and Analysis*, 2011, **3**, 404-416 (DOI:10.1002/dta.315).
10. UNODC, Global Drugs Assessment; Amphetamine-type stimulants and new psychoactive substances, 2017.
11. M. Majchrzak, R. Celiński, P. Kuś, T. Kowalska and M. Sajewicz, *Forensic Toxicol.*, 2018, **36**, 33-50 (DOI:10.1007/s11419-017-0385-6).
12. Jessica Welter-Luedeke and Hans H Maurer, *New psychoactive substances: chemistry, pharmacology, metabolism, and detectability of amphetamine derivatives with modified ring systems*, Lippincott Williams & Wilkins Ovid Technologies, United States, 2016.
13. R. S. Vardanyan and V. J. Hruby, *Fentanyl-related compounds and derivatives: Current status and future prospects for pharmaceutical applications*, England, 2014.
14. A. Guirguis, S. Girotto, B. Berti and J. L. Stair, *Forensic Sci. Int.*, 2017, **273**, 113-123 (DOI://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.01.027).
15. I. González-Mariño, E. Gracia-Lor, R. Bagnati, C. P. B. Martins, E. Zuccato and S. Castiglioni, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 4297-4309 (DOI:10.1007/s00216-016-9521-0).
16. M. P. Elie, L. E. Elie and M. G. Baron, *Drug Test. Analysis*, 2013, **5**, 281-290 (DOI:10.1002/dta.1434).
17. S. Higson, *Analytical chemistry*, Oxford University Press, Oxford ; New York, 2004, s. 6.
18. A. Namera, M. Kawamura, A. Nakamoto, T. Saito and M. Nagao, *Forensic Toxicol.*, 2015, **33**, 175-194 (DOI:10.1007/s11419-015-0270-0).

19. S. Stein, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 7274-7282 (DOI:10.1021/ac301205z).
20. S. Hegstad, A. A. Westin and O. Spigset, *jat*, 2015, **39**, 280-286 (DOI:10.1093/jat/bkv013).
21. S. Graziano, L. Anzillotti, G. Mannocchi, S. Pichini and F. P. Busardò, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, **163**, 170-179 (DOI://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.011).
22. M. Adler, S. Schulz and M. Spengler, *Biotech., C.*, ed, 2009, .
23. D. H. Wilson, D. M. Rissin, C. W. Kan, D. R. Fournier, T. Piech, T. G. Campbell, R. E. Meyer, M. W. Fishburn, C. Cabrera, P. P. Patel, E. Frew, Y. Chen, L. Chang, E. P. Ferrell, V. von Einem, W. McGuigan, M. Reinhardt, H. Sayer, C. Vielsack and D. C. Duffy, *J Lab Autom.*, 2016, **21**, 533-547 (DOI:10.1177/2211068215589580).
24. N. Langer, F. Steinicke, R. Lindigkeit, L. Ernst and T. Beuerle, *Forensic Sci. Int.*, 2017, **280**, 25-34 (DOI://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.09.011).
25. L. E. Regester, J. D. Chmiel, J. M. Holler, S. P. Vorce, B. Levine and T. Z. Bosy, *jat*, 2014, **39**, 144-151 (DOI:10.1093/jat/bku133).
26. M. Pettersson Bergstrand, A. Helander, T. Hansson and O. Beck, *Drug Test. Analysis*, 2017, **9**, 640-645 (DOI:10.1002/dta.2003).
27. D. Guerrieri, F. Kjellqvist, R. Kronstrand and H. Gréen, *J. Anal. Toxicol.*, 2018, , bky060.
28. A. T. Caspar, J. B. Gaab, J. A. Michely, S. D. Brandt, M. R. Meyer and H. H. Maurer, *Drug Test. Analysis*, 2018, **10**, 184-195 (DOI:10.1002/dta.2197).
29. S. Odoardi, M. Fisichella, F. S. Romolo and S. Strano-Rossi, *Journal of Chromatography B*, 2015, 1000, 57-68 (DOI://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.007).
30. X. Zhu, Y. Chen and R. Subramanian, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 1202-1209 (DOI:10.1021/ac403385y).
31. G. Siuzdak, *Journal of Laboratory Automation*, 2004, **9**, 50-63 (DOI: 10.1016/j.jala.2004.01.004).
32. S. Hudson and J. Ramsey, *Drug Test Analysis*, 2011, **3**, 466-478 (DOI:10.1002/dta.268).
33. M. R. Meyer and H. H. Maurer, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **927**, 13-20 (DOI://doi.org/10.1016/j.aca.2016.04.046).
34. B. Rochat, Quantitative and Qualitative LC-High-Resolution MS: The Technological and Biological Reasons for a Shift of Paradigm, IntechOpen, 2018, (DOI: 10.5772/intechopen.81285.)
35. W. F. Duvivier, T. A. van Beek and M. W. F. Nielen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2016, **30**, 2331-2340 (DOI:10.1002/rcm.7722).
36. A. G. Brenton and A. R. Godfrey, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2010, **21**, 1821-1835 (DOI:10.1016/j.jasms.2010.06.006).
37. H. H. Maurer, *Journal of Chromatography A; State-of-the art of (UHP)LC--MS(--MS) techniques and their practical application*, 2013, **1292**, 19-24 (DOI://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.069).
38. M. Sargent (Ed.), *Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements*, RSC Analytical Methods Committee, 2013. ISBN 978-0-948926-27-3.
39. M. H. Y. Tang, C. K. Ching, C. Y. W. Lee, Y. Lam and T. W. L. Mak, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2014, **969**, 272-284 (DOI:10.1016/j.jchromb.2014.08.033).
40. P. Adamowicz and B. Tokarczyk, *Drug Test. Analysis*, 2016, **8**, 652-667 (DOI:10.1002/dta.1815).

41. P. O. M. Gundersen, O. Spigset and M. Josefsson, *Drug Test Anal*, 2019, **11**, 51-67 (DOI:10.1002/dta.2464).
42. A. Pelander, P. Decker, C. Baessmann and I. Ojanperä, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2011, **22**, 379-385 (DOI:10.1007/s13361-010-0046-z).
43. T. Rousu, J. Herttuainen and A. Tolonen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 939-957 (DOI:10.1002/rcm.4465).
44. M. Holčápek, R. Jirásko and M. Lída, *Journal of Chromatography A; Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VII*, 2012, **1259**, 3-15 (DOI://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072).
45. M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J. Veuthey and D. Guillarme, *Journal of Chromatography A; State-of-the art of (UHP)LC--MS(--MS) techniques and their practical application*, 2013, **1292**, 2-18 (DOI://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.061).
46. E. N. Nikolaev, Y. I. Kostyukevich and G. N. Vladimirov, *Mass Spec Rev*, 2016, **35**, 219-258 (DOI:10.1002/mas.21422).
47. D. F. Smith, D. C. Podgorski, R. P. Rodgers, G. T. Blakney and C. L. Hendrickson, *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)*, 2018, **90**, 2041-2047 (DOI:10.1021/acs.analchem.7b04159).
48. F. M. Wylie, L. A. Nisbet, B. K. Logan and K. S. Scott, 2019, (DOI:10.1093/jat/bky109).
49. G. Mercieca, S. Odoardi, M. Cassar and S. Strano Rossi, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **149**, 494-501 (DOI://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.11.024).
50. S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. Thevis and K. Mercer-Chalmers-Bender, *Journal of Chromatography B*, 2017, **1064**, 124-138 (DOI://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.003).
51. F. Vaiano, F. P. Busardò, D. Palumbo, C. Kyriakou, A. Fioravanti, V. Catalani, F. Mari and E. Bertol, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **129**, 441-449 (DOI://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.009).
52. K. B. Scheidweiler, M. J. Y. Jarvis and M. A. Huestis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 883-897 (DOI:10.1007/s00216-014-8118-8).
53. M. Sundström, A. Pelander, V. Angerer, M. Hutter, S. Kneisel and I. Ojanperä, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, **405**, 8463-8474 (DOI:10.1007/s00216-013-7272-8).
54. I. V. Chernushevich, A. V. Loboda and B. A. Thomson, *J. Mass Spectrom.*, 2001, **36**, 849-865 (DOI:10.1002/jms.207).
55. S. Broecker, S. Herre, B. Wüst, J. Zweigenbaum and F. Pragst, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, **400**, 101-117 (DOI:10.1007/s00216-010-4450-9).
56. K. Arnhard, A. Gottschall, F. Pitterl and H. Oberacher, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 405-414 (DOI:10.1007/s00216-014-8262-1).
57. M. Sundström, I. Ojanperä and A. Pelander, *jat*, 2017, **41**, 623-630 (DOI:10.1093/jat/bkx044).
58. W. R. Plaß, T. Dickel and C. Scheidenberger, *International Journal of Mass Spectrometry; 100 years of Mass Spectrometry*, 2013, **349-350**, 134-144 (DOI://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.06.005).
59. D. P. Demarque, A. E. M. Crotti, R. Vessecchi, J. L. C. Lopes and N. P. Lopes, *Nat. Prod. Rep.*, 2016, **33**, 432-455 (DOI:10.1039/C5NP00073D).] [C. Noble, P. Weihe Dalsgaard, S. Stybe Johansen and K. Linnet, *Drug Test Anal*, 2018, **10**, 651-662 (DOI:10.1002/dta.2263).

60. T. Kind and O. Fiehn, *BMC Bioinformatics*, 2007, **8**, 105.
61. D. Pasin, A. Cawley, S. Bidny and S. Fu, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, **409**, 5821-5836 (DOI:10.1007/s00216-017-0441-4).
62. E. Tyrkkö, A. Pelander, R. A. Ketola and I. Ojanperä, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, **405**, 6697-6709 (DOI:10.1007/s00216-013-7137-1).
63. E. L. Schymanski, H. P. Singer, J. Slobodnik, I. M. Ipolyi, P. Oswald, M. Krauss, T. Schulze, P. Haglund, T. Letzel, S. Grosse, N. S. Thomaidis, A. Bletsou, C. Zwiener, M. Ibáñez, T. Portolés, R. de Boer, M. J. Reid, M. Onghena, U. Kunkel, W. Schulz, A. Guillon, N. Noyon, G. Leroy, P. Bados, S. Bogialli, D. Stipaničev, P. Rostkowski and J. Hollender, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, **407**, 6237-6255 (DOI:10.1007/s00216-015-8681-7).
64. J. Z. Seither, R. Hindle, L. Arroyo-Mora and A. P. De Caprio, *Forensic Chem.*, 2018, **9**, 12-20 (DOI:10.1016/j.forc.2018.03.003).
65. mzCloud.HighChem LLC. [Online]. [Viitattu: 31.4.2019] Saatavilla: <https://www.mzcloud.org>.

6. LIITTEET

Liite 1. Tutkitut yhdisteet ja niiden lyhenteet jaettuna yhdisteryhmiin.

Ryhmä	Lyhenne/Käyttönimi	Nimi
Synteettiset kannabinoidit	NM-2201	1-naftyyli 1-(5-fluoropentyl)-1H-indoli-3-karboksylaatti
	MDMB-CHMCZCA	metyyli (S)-2-(9-(sykloheksyyli)metyyli)-9H-karbatsoli-3-karboksamido)-3,3-dimetylibutanoaatti
	5F-3,5-AB-PFUPPYCA	(S)-N-(1-amino-3-metyyli-1-oksobutan-2-yyli)-1-(5-fluoropentyyli)-3-(4-fluorofenyyli)-1H-pyratsoli-5-karboksamidi
	AMB-CHMICA	metyyli (1-(sykloheksyyli)metyyli)-1H-indoli-3-karbonyyli)-L-valinaatti
	EMB-FUBINACA	etyyli (1-(4-fluorobentsyyli)-1H-indatsoli-3-karbonyyli)-L-valinaatti
	5F-MDMB-PICA	N-[[1-(5-fluoropentyyli)-1H-indoli-3-yl]karbonyyli]-3-metyyli-L-valiinin metyyliesteri
	JWH-018-M-5-OH-Ind	(5-hydroksi-1-pentyyli-1H-indol-3-yyli)(naftalen-1-yyli)-metanoni
	PB-22	1-pentyyli-8-kinolinyliesteri-1H-indoli-3-karboksyylihappo
	5F-MDMB-PICA M7	(S)-2-(1-(5-fluoropentyyli)-1H-indoli-3-karboksamido)-3,3-dimetylibutaanihappo
	5F-ADB M2	metyyli (S)-2-(1-(5-hydroksipentyyli)-1H-indatsoli-3-karboksamido)-3,3-dimetylibutanoaatti
Fentanyyli johdannaiset	5F-ADB M7	(S)-2-(1-(5-fluoripentyyli)-1H-indatsoli-3-karboksamido)-3,3-dimetylibutaanihappo
	4F-butyryfentanyyli	N-(4-fluorofenyyli)-N-[1-(2-fenyylietyyli)-4-piperidinyyli]butaaniamidi
	syklopentyylifentanyyli	N-(1-fenetylipiperidin-4-yyli)-N-fenyyli syklopentaanikarboksamidi
Katinonijohdannaiset	syklopropyylifentanyyli	N-(1-fenetylipiperidin-4-yyli)-N-fenyyli syklopropanikarboksamidi
	5-DBFPV	1-(2,3-dihydrobentsofuran-5-yyli)-2-(pyrrolidin-1-yyli)pentan-1-oni
	6-metoksimetyloni	1-(6-metoksibentso[d][1,3]dioksol-5-yyli)-2-(metyyliamino)propan-1-oni
	4-MEAP	2-(etyyliamino)-1-(4-metyylifenyyli)-1-pentanoni
		2-metyyli-4'-(metyylitio)-2-morfolinopropiofenoni
	efyloni (N-etyylipentyloni)	1-(1,3-bentsodioksol-5-yyli)-2-(etyyliamino)-1-pentanoni
	MPHP	2-(pyrrolidin-1-yyli)-1-(p-tolyyli)heksan-1-oni
	4F- α -POP	1-(4-metoksifenyyli)-2-(pyrrolidin-1-yyli)oktan-1-oni

Ryhmä	Lyhenne/Käyttönimi	Nimi
	MMDA-2	6-metoksi- α -metyyli-1,3-bentsodioksoli-5-etanamiini
	4-CDC	1-(4-klorofenyli)-2-(dimetyyliamino)propan-1-oni
	4-EMC	1-(4-etyylifenyli)-2-(metyyliamino)propan-1-oni
	α-PHiP	1-fenyli-2-(1-pyrrolidinyli)-1-heksanoni
	4F-α-PHIP	1-(4-fluorofenyli)-2-(1-pyrrolidinyli)-1-heksanoni
	4-met-α-PPP	2-(pyrrolidin-1-yyli)-1-(p-tolyli)propan-1-oni
Fenetyyliamiinijohdannaiset	DMPEA	3,4-dimetoksi-bentseenietanamiini
	5-IT	α -metyyli-1H-indoli-5-etanamiini
	3-FEA	N-etyyli-3-fluoro- α -metyyli-bentseenietanamiini
Synteettiset opioidit		3,4-dikloori-N-(2-kloorisykloheksyyli)-N-metyyli-bentsamidi
	apomorfiini	(6aR)-6-methyl-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibentso[de,g]kinoliini-10,11-dioli
	dekstrorfaani	(+)-17-metyyli-9a,13a,14a-morfinan-3-oli
	6α-naloksoli	(5 α ,6 α)-17-Allyyli-4,5-epoksimorfinaani-3,6,14-trioli
	propofoli glukuronidi (Na⁺-addukti)	(2S,3S,4S,5R,6S)-6-[2,6-di(propan-2-yyli)fenoksi]-3,4,5-trihydroksioksaani-2-karboksylihapon Na ⁺ -addukti
Bentsodiatsepaamit	norfludiatsepaami	7-kloori-5-(2-fluorofenyli)-1,3-dihydro-1,4-bentsodiatsepin-2-oni
	flunitratsolaami	6-(2-fluorofenyli)-1-metyyli-8-nitro-4H-[1,2,4]triatoli[4,3-a][1,4]bentsodiatsepiini
Tryptamiinit	4-AcO-DMT	3-(2-(dimetyyliamino)etyyli)-1H-indol-4-yyliasettaatti
	psilosiini	3-[2-(dimetyyliamino)etyyli]-1H-indol-4-oli
	4-Aco-Met	3-(2-etyyli(metyyli)aminoetyyli)-1H-indol-4-yyliasettaatti
Gliptiinit	alogliptiini	2-[[6-[(3R)-3-aminopiperidin-1-yyli]-3-metyyli-2,4-dioksoprimidin-1-yyli]metyyl]bentsonitriili
	saksagliptiini	(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroksi-1-adamantyli)asetyyli]-2-atsabisyklo[3.1.0]heksaani-3-karbonitriili
Sartaanit	eprosartaani	4-[[2-butyli-5-[(E)-2-karboksi-3-tiofen-2-yyli]prop-1-enyyli]imidatsol-1-yyli]metyyli]bentsoehappo
	valsartaani	(2S)-3-metyyli-2-[pentanoyyli]-[[4-[2-(2H-tetratsol-5-yyli)fenyyli]fenyyli]metyyli]amino]butaanihappo
	olmesartaani	5-(2-hydroksipropan-2-yyli)-2-propyyli-3-[[4-[2-(2H-tetratsol-5-yyli)fenyyli]fenyyli]metyyli]imidatsoli-4-karboksylihappo
Dihydropyridiinit	nisoldipiini	3-O-metyyli 5-O-(2-metyylipropyli) 2,6-dimetyyli-4-(2-nitrofenyyli)-1,4-dihydropyridiini-3,5-dikarboksylaatti
	nilvadipiini	3-O-metyyli 5-O-propan-2-yyli 2-syano-6-metyyli-4-(3-nitrofenyyli)-1,4-dihydropyridiini-3,5-dikarboksylaatti

Ryhmä	Lyhenne/Käyttönimi	Nimi
Muut	abakaviiri	[(1S,4R)-4-[2-amino-6-(syklopropyyliamino)purin-9-yyli]syklopent-2-en-1-yyli]metanoli
	kaptopriili	(2S)-1-[(2S)-2-metyyli-3-sulfanyylipropaanoyyli]pyrrolidiini-2-karboksylihappo
	glimepiridi	4-etyyli-3-metyyli-N-[2-[4-[(4-metyylisykloheksyyli)karbamoyylisulfamoyyli]fenyyli]etyyli]-5-okso-2H-pyrroli-1-karboksamidi
	eplerenoni	metyyli (1R,2S,9R,10R,11S,14R,15S,17R)-2,15-dimetyyli-5,5'-dioksospiro[18-oksapentasyklo[8.8.0.01,17.02,7.011,15]oktadek-6-eeni-14,2'-oksolaani]-9-karboksylaatti
	deltametriinin ammoniumaddukti	[(S)-syano-(3-fenoksifenyyli)metyyli] (1R,3R)-3-(2,2-dibromietenyli)-2,2-dimetyylisyklopropani-1-karboksylaatti
	THC	(-)-(6aR,10aR)-6,6,9-trimetyyli-3-pentyyli-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-bentso[c]kromen-1-oli
	mitragyniini	metyyli (E)-2-[(2S,3S,12bS)-3-etyyli-8-metoksi-1,2,3,4,6,7,12,12b-oktahydroindoli[2,3-a]kinolitsin-2-yyli]-3-metoksiprop-2-enoaatti
	4F-etyylifenidaatti	metyyli 2-(4-fluorofenyyli)-2-(piperidin-2-yyli)asettaatti

Liite 2. Yhdisteiden retentioajat UHPLC-QTOF laitteistolla mitattuna.

Nimi	RT	Nimi	RT
NM-2201	14,46	5-IT	3,35
MDMB-CHMCZCA	15,52	3-FEA	5,16
5F-3,5-AB-PFUPPYCA	12,43	3,4-dikloori-N-(2-kloorisykloheksyyli)-N-metyyllibentsamidi	13,35
AMB-CHMICA	14,24	apomorfiini	4,39
EMB-FUBINACA	13,73	dekstrorfaani	5,88
5F-MDMB-PICA	13,18	6 α -naloksoli	2,05
JWH-018-M-5-OH-Ind	13,47	propofoli glukuronidi Na ⁺ -addukti	11,21
PB-22	14,09	norfludiatsepaami	10,91
5F-MDMB-PICA M7	12,39	flunitratsolaami	9,28
5F-ADB M2	12,26	4-AcO-DMT	4,00
5F-ADB M7	12,63	psilosiini	2,03
4F-butyryfentanyyli	8,96	4-Aco-Met	4,68
syklopentyylifentanyyli	9,98	alogliptiini	5,30
syklopropyyllifentanyyli	8,54	saksagliptiini	3,98
5-DBFPV	7,23	eprosartaani	8,72
6-metoksimetyloni	4,51	valsartaani	11,93
4-MEAP	7,91	olmesartaani	8,24
2-metyyli-4'-(metyyllitio)-2-morfolinopropiofenoni	11,45	nisoldipiini	12,58
efyloni (N-etyyllipentyloni)	6,63	nilvadipiini	12,24
MPHP	8,92	abakaviiri	4,80
4F-alpha-POP	10,19	kaptopriili	6,22
MMDA-2	5,42	glimepiridi	12,89
4-kloori-N,N-dimetyyli-4-kinononi (4-CDC)	5,47	eplerenoni	9,42
4-EMC	6,75	deltametriinin ammoniumaddukti	15,20
α -PHIP	7,66	THC	15,42
4F- α -PHIP	8,05	mitragyniini	8,39
4-met- α -PPP	5,91	4F-etyyllifenidaatti	7,69
DMPEA	2,56	nortsopikloni	9,64

Liite 3. Synteettisten kannabinoidien prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Synteettiset kannabinoidit					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
NM-2201	C ₂₄ H ₂₂ FNO	376,1707	C ₁₄ H ₁₅ FNO	232,1132	Parillinen
MDMB-CHMCZCA	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₃	435,2642	C ₂₀ H ₂₀ NO	290,1539	Parillinen
5F-3,5-AB-PFUPPYCA	C ₂₀ H ₂₆ F ₂ N ₄ O ₂	393,2097	C ₁₉ H ₂₄ F ₂ N ₃ O	348,1882	Parillinen
			C ₁₄ H ₁₅ FN ₃ O	260,1194	Parillinen
			C ₁₅ H ₁₅ F ₂ N ₂ O	277,1147	Parillinen
			C ₁₀ H ₈ FN ₂ O ₂	207,0564	Parillinen
AMB-CHMICA	C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₃	371,2329	C ₁₆ H ₁₈ NO	240,1383	Parillinen
EMB-FUBINACA	C ₂₂ H ₂₄ FN ₃ O ₃	398,1874	C ₁₅ H ₁₀ FN ₂ O	253,0772	Parillinen
			C ₁₉ H ₁₉ FN ₃ O	324,1507	Parillinen
			C ₁₅ H ₁₂ FN ₂ O ₂	271,0877	Parillinen
			C ₇ H ₆ F	109,0448	Parillinen
5F-MDMB-PICA	C ₂₁ H ₂₉ FNO	377,2235	C ₁₄ H ₁₅ FNO	232,1132	Parillinen
JWH-018-M-5-OH-Ind	C ₂₄ H ₂₃ NO ₂	358,1802	C ₁₁ H ₇ O	155,0491	Parillinen
			C ₁₄ H ₁₆ NO ₂	230,1176	Parillinen
PB-22	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₂	359,1754	C ₁₄ H ₁₆ NO	214,1226	Parillinen
5F-MDMB-PICA M7	C ₂₀ H ₂₇ FN ₂ O ₃	363,2078	C ₁₄ H ₁₅ FNO	232,1132	Parillinen
5F-ADB M2	C ₂₀ H ₂₉ N ₃ O ₄	376,2231	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O	213,1022	Parillinen
			C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₂	231,1128	Parillinen
			C ₁₈ H ₂₆ N ₃ O ₂	316,2020	Parillinen
5F-ADB M7	C ₁₉ H ₂₆ FN ₃ O ₃	364,2031	C ₁₃ H ₁₄ FN ₂ O	233,1085	Parillinen
			C ₁₃ H ₁₆ FN ₂ O ₂	251,1190	Parillinen
			C ₁₈ H ₂₅ FN ₃ O	318,1976	Parillinen
			C ₁₃ H ₁₃ FN ₂ O	213,1022	Parillinen

Liite 4. Fentanyylijohtannaisten prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Fentanyylijohtannaiset					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu $[M+H^+]$	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
4F-butyryfentanyyli	$C_{23}H_{29}FN_2O$	369,2337	$C_{13}H_{18}N$	188,1434	Parillinen
syklopentyylifentanyyli	$C_{25}H_{32}N_2O$	377,2587	$C_{13}H_{18}N$	188,1434	Parillinen
syklopropyyllifentanyyli	$C_{23}H_{28}N_2O$	349,2274	$C_{13}H_{18}N$	188,1434	Parillinen

Liite 5. Katinonijohdannaisten prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Katinonijohdannaiset					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu $[M+H^+]$	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
5-DBFPV	$C_{17}H_{23}NO_2$	274,1802	$C_8H_{16}N$	126,1277	Parillinen
			$C_{13}H_{15}O_2$	203,1067	Parillinen
			C_9H_9O	133,0648	Parillinen
			$C_9H_7O_2$	147,0441	Parillinen
			$C_{12}H_{15}O$	175,1117	Parillinen
6-metoksimetyloni	$C_{12}H_{15}NO_4$	238,1074	$C_{11}H_{12}NO_2$	190,0863	Parillinen
			$C_{10}H_{12}NO$	162,0913	Parillinen
			$C_{10}H_{11}O_3$	179,0703	Parillinen
4-MEAP	$C_{14}H_{21}NO$	220,1696	$C_{11}H_{13}N$	159,1043	Pariton
			$C_{10}H_{10}N$	144,0808	Parillinen
			C_8H_9	105,0699	Parillinen
			$C_9H_{10}N$	132,0808	Parillinen
			$C_{12}H_{15}N$	173,1199	Pariton
2-metyyli-4'-(metyylitio)-2-morfolinopropiofenoni	$C_{15}H_{21}NO_2S$	280,1366	$C_{10}H_{13}S$	165,0732	Parillinen
			$C_4H_{10}NO$	88,0757	Parillinen
			$C_7H_{14}NO$	128,1070	Parillinen
efyloni (N-etyylipentyloni)	$C_{14}H_{19}NO_3$	250,1438	$C_{13}H_{16}NO$	202,1226	Parillinen
			$C_{11}H_{11}NO_2$	189,0784	Pariton
			$C_8H_7O_2$	135,0441	Parillinen
			$C_8H_5O_3$	149,0233	Parillinen

Kationijohdannaiset					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
			C ₁₁ H ₁₁ O ₂	175,0754	Parillinen
MPHP	C ₁₇ H ₂₅ NO	260,2009	C ₉ H ₁₈ N	140,1423	Parillinen
			C ₈ H ₇ O	119,0481	Parillinen
			C ₁₃ H ₁₇ O	189,1258	Parillinen
			C ₉ H ₉ O	133,0635	Parillinen
4F-α-POP	C ₁₈ H ₂₆ FNO	292,2071	C ₇ H ₆ F	109,0448	Parillinen
			C ₁₁ H ₂₂ N	168,1747	Parillinen
MMDA-2	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	210,1125	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178,0624	Pariton
			C ₉ H ₉ O ₃	165,0546	Parillinen
			C ₁₁ H ₁₃ O ₃	193,0859	Parillinen
			C ₈ H ₇ O ₂	135,0441	Parillinen
			C ₉ H ₁₁ O	135,0804	Parillinen
4-kloori-N,N-dimetyyli-katinoni (4-CDC)	C ₁₁ H ₁₄ ClNO	212,0837	C ₈ H ₈ Cl	139,0309	Parillinen
			C ₈ H ₇	103,0542	Parillinen
			C ₄ H ₁₀ N	72,0808	Parillinen
			C ₉ H ₈ ClO	167,0258	Parillinen
			C ₇ H ₄ ClO	138,9945	Parillinen
4-EMC	C ₁₂ H ₁₇ NO	192,1383	C ₁₀ H ₁₁ N	145,0886	Pariton
α-PHiP	C ₁₆ H ₂₃ NO	246,1852	C ₇ H ₇	91,0542	Parillinen
			C ₉ H ₁₈ N	140,1434	Parillinen
			C ₇ H ₅ O	105,0335	Parillinen
			C ₁₂ H ₁₅ NO	189,1148	Pariton
			C ₈ H ₇ O	119,0491	Parillinen
4F-α-PHIP	C ₁₆ H ₂₂ FNO	264,1758	C ₇ H ₆ F	109,0448	Parillinen
			C ₉ H ₁₈ N	140,1434	Parillinen
			C ₇ H ₄ FO	123,0241	Parillinen
4-met-α-PPP	C ₁₄ H ₁₉ NO	218,1539	C ₉ H ₁₁	119,0855	Parillinen
			C ₆ H ₁₂ N	98,0964	Parillinen
			C ₁₀ H ₁₁ O	147,0804	Parillinen

Liite 6. Fenetyyliamiini johdannaisten prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Fenetyyliamiini johdannaiset					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
DMPEA	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	182,1176	C ₁₀ H ₁₃ O ₂	165,0910	Parillinen
			C ₉ H ₁₀ O ₂	150,0675	Pariton
			C ₈ H ₇ O ₂	135,0441	Parillinen
			C ₈ H ₉	105,0699	Parillinen
			C ₇ H ₇ O	107,0491	Parillinen
5-IT	C ₁₁ H ₁₄ N ₂	175,1230	C ₉ H ₈ N	130,0651	Parillinen
			C ₈ H ₇ N	117,0573	Pariton
			C ₁₁ H ₁₂ N	158,0964	Parillinen
			C ₁₀ H ₉ N	143,0730	Pariton
3-FEA	C ₁₁ H ₁₆ FN	182,1340	C ₇ H ₆ F	109,0448	Parillinen

Liite 7. Synteettisten opioidien prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Synteettiset opioidit					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
3,4-dikloori-N-(2-kloorisykloheksyyli)-N-metyyli-bentsamidi	C ₁₄ H ₁₆ Cl ₃ NO	320,0370	C ₇ H ₃ Cl ₂ O	172,9555	Parillinen
			C ₈ H ₈ Cl ₂ NO	203,9977	Parillinen
			C ₆ H ₉	81,0699	Parillinen
			C ₁₄ H ₁₆ Cl ₂ NO	284,0603	Parillinen
apomorfiini	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	268,1332	C ₁₆ H ₁₁ O	219,0804	Parillinen
			C ₁₆ H ₁₃ O ₂	237,0910	Parillinen
			C ₁₅ H ₁₁	191,0855	Parillinen
dekstrorfaani	C ₁₇ H ₂₃ NO	258,1852	C ₁₄ H ₁₅ O	199,1117	Parillinen
			C ₁₄ H ₁₇ O	201,1274	Parillinen
			C ₉ H ₉ O	133,0648	Parillinen
6α-naloksoli	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	330,1700	C ₁₉ H ₂₂ NO ₃	312,1594	Parillinen
propofoli glukuronidi Na ⁺ -addukti	C ₁₈ H ₂₅ NaO ₇	377,1571	C ₆ H ₅ O ₄	141,0182	Parillinen
			C ₆ H ₈ NaO ₆	199,0213	Parillinen

Liite 8. Bentsodiatsepiinien prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Bentsodiatsepiinit					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
norfludiatsepaami	C ₁₅ H ₁₀ ClFN ₂ O	289,0538	C ₇ H ₇ ClN	140,0262	Parillinen
			C ₁₄ H ₁₁ FN ₂	226,0901	Pariton
			C ₁₄ H ₁₁ ClFN ₂	261,0589	Parillinen
flunitratsolaami	C ₁₇ H ₁₂ FN ₅ O ₂	338,1048	C ₁₇ H ₁₃ FN ₄	292,1119	Pariton
			C ₁₆ H ₁₁ FN ₄ O ₂	310,0861	Pariton
			C ₁₇ H ₁₃ FN ₄ O ₂	324,1017	Pariton

Liite 9. Tryptamiinien prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Tryptamiinit					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
4-AcO-DMT	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂	247,1441	C ₁₀ H ₁₀ NO	160,0757	Parillinen
			C ₁₂ H ₁₇	161,1325	Parillinen
psilosiini	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	205,1335	C ₁₀ H ₁₀ NO	160,0757	Parillinen
			C ₉ H ₇	115,0542	Parillinen
			C ₉ H ₁₀ N	132,0808	Parillinen
4-AcO-MET	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	261,1598	C ₁₀ H ₁₀ NO	160,0757	Parillinen
			C ₄ H ₁₀ N	72,0808	Parillinen
			C ₁₂ H ₁₂ NO ₂	202,0863	Parillinen

Liite 10. Gliptiinien prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Gliptiinit					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
alogliptiini	C ₁₈ H ₂₁ N ₅ O ₂	340,1768	C ₈ H ₆ N	116,0495	Parillinen
			C ₁₈ H ₁₉ N ₄ O ₂	323,1503	Parillinen
saksagliptiini	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₂	316,2020	C ₁₇ H ₂₆ N ₃ O	288,2070	Parillinen

Liite 11. Sartaanien prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Sartaanit					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
eprosartaani	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄ S	425,1530	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O ₂	207,1128	Parillinen
			C ₈ H ₇ O ₂	135,0441	Parillinen
valsartaani	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃	436,2343	C ₁₄ H ₁₁ N ₂	207,0917	Parillinen
			C ₁₄ H ₁₁ N ₄	235,0978	Parillinen
			C ₁₇ H ₁₇ N ₅	291,1478	Pariton
			C ₁₈ H ₂₀ N ₅	306,1713	Parillinen
olmesartaani	C ₂₄ H ₂₆ N ₆ O ₃	447,2139	C ₁₄ H ₁₁ N ₂	207,0917	Parillinen
			C ₁₄ H ₁₁ N ₄	235,0978	Parillinen

Liite 12. Dihydropyridiiniinien prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Dihydropyridiiniit					
Nimi	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
nisoldipiini	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₆	389,1707	C ₁₄ H ₁₁ N ₂ O ₂	239,0815	Parillinen
			C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	254,1050	Pariton
			C ₁₃ H ₁₁ N ₂	195,0917	Parillinen
			C ₇ H ₇ O	107,0491	Parillinen
			C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂	296,1519	Pariton
nilvadipiini	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₆	386,1347	C ₁₆ H ₁₂ N ₃ O ₅	326,0771	Parillinen
			C ₁₅ H ₁₀ N ₃ O ₅	312,0615	Parillinen

Liite 13. Muiden tutkittujen yhdisteiden prekursorit, fragmentit ja niiden m/z -arvot.

Muut						
Nimi	Luokka	Molekyylikaava	m/z laskettu [M+H ⁺]	Fragmenttien bruttokaavat	m/z laskettu	Pariteetti
abakaviiri	karbosyklinen nukleosidi	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O	287,1615	C ₈ H ₁₁ N ₆	191,1040	Parillinen
kaptopriili	ACE-estäjä	C ₉ H ₁₅ NO ₃ S	218,0845	C ₅ H ₁₀ NO ₂	116,0706	Parillinen
				C ₄ H ₈ N	70,0651	Parillinen
glimepiridi	sulfonyyliurean johdannainen	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	491,2323	C ₁₆ H ₂₂ N ₃ O ₄ S	352,1326	Parillinen
				C ₇ H ₁₂ NO	126,0913	Parillinen
				C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₄ S	335,1060	Parillinen
eplerenoni	spirolaktoni	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	415,2115	C ₁₀ H ₁₁ O ₂	163,0754	Parillinen
				C ₂₂ H ₂₅ O ₃	337,1798	Parillinen
				C ₈ H ₉ O ₁	121,0648	Parillinen
				C ₂₂ H ₂₃ O ₂	319,1693	Parillinen
deltametriinin ammoniumaddukti	pyretroidi	C ₂₂ H ₂₂ Br ₂ N ₂ O ₃	521,0070	C ₈ H ₉ Br ₂ O	278,9015	Parillinen
				C ₇ H ₇ O	107,0491	Parillinen
				C ₁₄ H ₁₀ NO	208,0757	Parillinen
				C ₁₃ H ₉ O	181,0648	Parillinen
				C ₉ H ₉ O ₂	149,0597	Parillinen
THC	kannabinoidi	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	315,2319	C ₁₂ H ₁₇ O ₂	193,1223	Parillinen
				C ₁₇ H ₂₃ O ₂	259,1693	Parillinen
				C ₁₀ H ₁₅	135,1168	Parillinen
				C ₁₆ H ₂₃ O ₂	247,1693	Parillinen
				C ₇ H ₇ O ₂	123,0441	Parillinen
mitragyniini	opiaatti	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄	399,2278	C ₁₁ H ₁₂ NO	174,0913	Parillinen
				C ₁₂ H ₂₀ NO ₃	226,1438	Parillinen
				C ₁₃ H ₂₀ NO ₃	238,1438	Parillinen
				C ₂₂ H ₂₇ N ₂ O ₃	367,2016	Parillinen
4F-etyylifenidaatti	piperidiini, pyrrolidiini	C ₁₅ H ₂₀ FNO ₂	266,1551	C ₅ H ₁₀ N	84,0808	Parillinen

Liite 14. Algoritmien vertailu massatarkkuudella 10 mDa. Yhdisteet joiden nimen perään on lisätty tähti olivat voimakkaasti pilkkoutuneita, ja niiden spektrihaut suoritettiin 1,5 %:n suhteellisen intensiteetin raja-arvolla.

	HighRes			Opt. Dot Product			NIST		
	Tunnistus nro	Yhtäläisyys (%)	Toisiksi paras / väärä tunnistus (%)	Tunnistus nro	Yhtäläisyys (%)	Toisiksi paras / väärä tunnistus (%)	Tunnistus nro	Yhtäläisyys (%)	Toisiksi paras / väärä tunnistus (%)
NM-2201	1	83.9	80.9	2	92.6	96.9	2	72.3	77.8
MDMB-CHMCZCA	1	78.9	53.1	1	96.7	12.5	1	73.1	22.2
5F-3,5-AB-PFUPPYCA	1	81.2	53	1	93	21.8	1	75.9	41.4
AMB-CHMICA	1	81.4	79.6	1	98	97.9	1	80.9	80.2
EMB-FUBINACA	1	82.2	80.8	1	80.5	69.1	1	64.1	61.2
5F-MDMB-PICA	2	85.2	85.6	2	97.5	98.5	2	83.6	81.4
JWH-018-M-5-OH-Ind	2	81.2	81.6	2	93.2	94.5	2	76.2	76.6
PB-22	1	87.3	72.6	1	97	8	1	77.9	25.3
5F-MDMB-PICA M7	2	77.9	81.8	2	91.3	91.5	2	75.8	78
5F-ADB M7	1	81.8	75.6	1	60.4	32.8	1	58.5	42.3
4F-butyrylfentanyyli	3	82.9	83.4	1	96.5	95.6	1	70.5	70.4
syklopropyylifentanyyli	1	88.4	78.5	1	96.6	72.4	1	75.6	56.1
5-DBFPV	1	87.0	72.5	1	97.6	0	1	82	36
6-metoksimeetyloni	1	85.5	81.4	2	18.6	76.6	2	63	65.2
4-MEAP	1	91.6	87.4	1	94.4	64.7	1	84.1	46.6
efyloni (N-etyylipentyloni)	1	89.2	86.4	1	96.5	66.5	1	88.2	64.1
MPPH	1	86.5	82	1	96	41.2	1	73.6	42
4F-alpha-POP	1	86.1	84.7	2	83.3	93.6	1	76.1	73.9
MMDA-2	1	87.4	82	1	94.9	92	1	73.7	67.6
4-EMC	1	93.2	92.6	3	98.6	99.2	2	85.7	84.2
alpha-PHIP	1	85.7	66.4	1	84.3	25	1	67.9	36.5
4F-alpha-PHIP	1	81.1	62.4	1	43.3	12.3	1	58.1	34.2
4-met-alfa-PPP	1	90.3	90	1	98.6	96.6	1	83.1	81.7
DMPEA	1	86.0	80.8	1	62	58.2	1	69	46.3
5-IT	1	86.9	86.4	1-2	98.3	98.3	2	75	75.2
apomorfiini	1	80.8	38	1	96.5	21.6	1	72.5	22.5
dekstrorfaani	1	84.9	84.8	1	97.9	96.5	1	82.5	77.1
6α-naloksoli	1	84.7	84.5	2	97.4	97.5	2	77.3	77.6
norfludiatsepaami	1	78.1	76.4	1	94.5	76.4	1	69.2	59.2
4-Aco-DMT*	3	44.1	55.1	3	10.2	15.1	13	19.6	31.7
psilosini*	2	72.3	76.2	2	21.2	23.6	2	56.8	72.6
4-Aco-Met*	1	63.4	58.1	2	48.7	65.5	1	34.7	34.3
eprosartaani	1	82.7	64	1	89.4	26.8	1	71.4	33
valsartaani*	1	76.3	31.9	1	59.1	12.7	1	61.4	20.1
olmesartaani	1	79.3	63.3	1	88.1	8.7	1	58.5	33
abakaviiri	1	87.4	68.2	1	98.3	20.9	1	81.2	35.1
kaptopriili	1	81.1	74.9	1	89	24.7	1	59.1	56.8
glimepiridi	1	79.5	49	1	63.4	13.7	1	53.9	32.9
eplerenoni*	1	83.0	69.6	1	92.7	24.6	1	74	25.3
THC*	1	86.9	86.8	1	95.1	94.6	2	73.9	74.6
mitragyniini	1	85.2	64.2	1	95	94.5	3	80.5	81.1
5F-ADB M2	-	-	61.8	-	-	20.5	-	-	25
syklopentyylifentanyyli	-	-	58	-	-	20.3	-	-	34.2
2-metyyli-4'-(metyylitio)-2-morfolinopropiofenoni	-	-	70.7	-	-	44.4	-	-	55.1
4-kloori-N,N-dimetyyli-4-aminononi (4-CDC)	-	-	69.9	-	-	19.1	-	-	35.5
3-FEA	-	-	62.2	-	-	12	-	-	22.6
3,4-dikloori-N-(2-kloorisykloheksyyli)-N-metylibentsamidi	-	-	55.9	-	-	20.4	-	-	30.4
propofoli glukuronidi Na ⁺ -addukti*	-	-	70.1	-	-	24.9	-	-	43
flunitratsolaami	-	-	78.3	-	-	61.7	-	-	52.9
alogliptiini	-	-	68.2	-	-	24.4	-	-	54.4
saksagliptiini*	-	-	82.8	-	-	90.4	-	-	63.4
nisoldiipiini*	-	-	52.6	-	-	14.2	-	-	38
nilvadipiini	-	-	57.9	-	-	5.1	-	-	22.7
deltametriinin ammoniumaddukti*	-	-	5.7	-	-	0	-	-	13.1
4F-etyylifenidaatti	-	-	73.6	-	-	15	-	-	25.9

Liite 15. Synteettisten kannabinoidien m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat.

Synteettiset kannabinoidit			
Nimi	Tunnistus nro	Spektrien yhtäläisyys (%)	NCE
NM-2201	1	83,9	10
MDMB-CHMCZCA	1	78,9	20
5F-3,5-AB-PFUPPYCA	1	81,2	30
AMB-CHMICA	1	81,4	10
EMB-FUBINACA	1	82,2	10
5F-MDMB-PICA	1	85,2	20
JWH-018-M-5-OH-Ind	2	81,2	20
PB-22	1	87,3	20
5F-MDMB-PICA M7	2	77,9	20
5F-ADB M2	-	-	-
5F-ADB M7	1	81,8	10

Liite 16. Fentanyylijohdannaisten m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat.

Fentanyylijohdannaiset			
Nimi	Tunnistus nro	Spektrien yhtäläisyys (%)	NCE
4F-butyryfentanyyli	3	82,9	30
syklopentyylifentanyyli	-	-	-
syklopropyylifentanyyli	1	88,4	30

Liite 17. Katinonijohdannaisten m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat.

Katinonijohdannaiset			
Nimi	Tunnistus nro	Spektrien yhtäläisyys (%)	NCE
5-DBFPV	1	87,0	30
6-metoksimetyloni	1	85,5	40
4-MEAP	1	91,6	50
2-metyyli-4'-(metyylitio)-2-morfolinopropiofenoni	-	-	-
efyloni (N-etyylipentyloni)	1	89,2	30
MPHP	1	86,5	40
4F-alpha-POP	1	86,1	30
MMDA-2	1	87,4	50
4-kloori-N,N-dimetyyli-katinoni (4-CDC)	-	-	-
4-EMC	1	93,2	50
alfa-PHiP	1	85,7	40
4F-alfa-PHIP	1	81,1	50
4-met-alfa-PPP	1	90,3	40

Liite 18. Fenetyyliamiinijohdannaisten m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat.

Fenetyyliamiinijohdannaiset			
Nimi	Tunnistus nro	Spektrien yhtäläisyys (%)	NCE
DMPEA	1	86,0	10
5-IT	1	86,9	60
3-FEA	-	-	-

Liite 19. Synteettisten opioidien m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat.

Synteettiset opioidit			
Nimi	Tunnistus nro	Spektrien yhtäläisyys (%)	NCE
3,4-dikloori-N-(2-kloorisykloheksyyli)-N-metyyllibentsamidi	-	-	-
apomorfiini	1	80,8	50
dekstrorfaani	1	84,9	30
6 α -naloksoli	1	84,7	30
propofoli glukuronidi Na ⁺ -addukti	-	-	-

Liite 20. Bentsodiatsepiinien m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat.

Bentsodiatsepiinit			
Nimi	Tunnistus nro	Spektrien yhtäläisyys (%)	NCE
norfludiatsepaami	1	78,1	30
flunitratsolaami	-	-	-

Liite 21. Tryptamiinien m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat. Yhdisteet joiden nimen perään on lisätty tähti olivat voimakkaasti pilkkoutuneita, ja niiden spektrihaut suoritettiin 1,5 %:n suhteellisen intensiteetin raja-arvolla.

Tryptamiinit			
Nimi	Tunnistus nro	Kromatogrammien yhtäläisyys (%)	NCE
4-AcO-DMT*	3	44,1	60
psilosiini*	2	72,3	50
4-AcO-MET*	1	63,4	40

Liite 22. Sartaanien m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat. Yhdisteet joiden nimen perään on lisätty tähti olivat voimakkaasti pilkkoutuneita, ja niiden spektrihaut suoritettiin 1,5 %:n suhteellisen intensiteetin raja-arvolla.

Sartaanit			
Nimi	Tunnistus nro	Kromatogrammien yhtäläisyys (%)	NCE
eprosartaani	1	82,7	30
valsartaani*	1	76,3	30
olmesartaani	1	79,3	30

Liite 23. Muiden yhdisteiden m/zCloud tunnistusprosentit ja kirjastospektrien normalisoidut törmäysenergiat. Yhdisteet joiden nimen perään on lisätty tähti olivat voimakkaasti pilkkoutuneita, ja niiden spektrihaut suoritettiin 1,5 %:n suhteellisen intensiteetin raja-arvolla.

Muut				
Nimi	Luokka	Tunnistus nro	Spektrien yhtäläisyys (%)	NCE
abakaviiri	karbosyklinen nukleosidi	1	87,4	40
kaptopriili	ACE-estäjä	1	81,1	20
glimepiridi	syfonyyliurean johdannainen	1	79,5	10
eplerenoni*	spirolaktoni	1	83,0	10
deltametriinin ammoniumaddukti	pyretroidi	-	-	-
THC*	kannabinoidi	1	86,9	30
mitragyniini	opiaatti	1	85,2	30
4F-etyylifenidaatti	piperidiini, pyrrolidiini	-	-	-